

525105

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/018678 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, 1/19, 1/21, 5/10,  
C07K 14/82, 16/32, C12P 21/02, C12Q 1/68, A61P 35/00,  
43/00, A61K 31/7088, 38/17, 39/395, 45/00, 48/00

(SATO,Shuji) [JP/JP]; 〒300-3261 茨城県 つくば市 花  
畑 3 丁目 1 9-9-3 0 1 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010532

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI,Shuichi et al.);  
〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目  
1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Os-  
aka (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 20 日 (20.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-240830 2002 年 8 月 21 日 (21.08.2002) JP  
特願 2002-363108  
2002 年 12 月 13 日 (13.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,  
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修  
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石井 尚書  
(ISHII,Takafumi) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つく  
ば市 並木 4 丁目 1 6-1 Ibaraki (JP). 山本 紅司  
(YAMAMOTO,Koji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つく  
ば市 春日 1 丁目 7-9-1 2 0 2 Ibaraki (JP). 砂原 英  
次 (SUNAHARA,Eiji) [JP/JP]; 〒300-0331 茨城県 稲  
敷郡阿見町 阿見 5 3 5 1-5 Ibaraki (JP). 佐藤 秀司

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PREVENTIVES/REMEDIES FOR CANCER

(54) 発明の名称: 癌の予防・治療剤

(57) Abstract: A compound inhibiting the activity of a protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:25 or SEQ ID NO:27, or its salt; a compound inhibiting the expression of a gene of the above protein; an antisense polynucleotide having a base sequence, which is complementary or substantially complementary to the base sequence of a DNA encoding the above protein or its peptide fragment, or a part thereof; an antibody against the above protein or its peptide fragment, etc. are useful as preventives/remedies for cancer, apoptosis promoters for cancer cells and so on.

(57) 要約: 配列番号: 1、配列番号: 4、配列番号: 7、配列番号: 10、配列番号: 15、配列番号: 17、配列番号: 20、配列番号: 22、配列番号: 25 または配列番号: 27 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物、該タンパク質またはその部分ペプチドをコードする DNA の塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、該タンパク質またはその部分ペプチドに対する抗体などは、癌などの予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤などとして有用である。

WO 2004/018678 A1

## 明 細 書

## 癌の予防・治療剤

## 5 技術分野

本発明は、新規タンパク質、癌の予防・治療剤および診断薬などに関する。

## 背景技術

近年のマイクロアレイ・オリゴヌクレオチドアレイ技術の進歩により、遺伝子  
10 発現の網羅的な解析が可能となってきた。癌においても遺伝子のマイクロアレイ  
プロファイリングデータでその病態が評価しうることも予見され、実際、白血病  
においては遺伝子発現プロファイルによる白血病の分類が可能であることが報告  
されている。また個々の癌組織の遺伝子発現プロファイルを明らかにし、その分  
15 類を積み重ねることによって、特定の癌治療法に対する反応性を予測したり特定  
の癌に対する新たな創薬標的タンパク質を発見したりすることが可能となると考  
えられる。具体的には、ある種の癌である種のタンパク質の発現亢進が認められ  
る場合には、新たに抗原陽性と診断された患者に対して (i) その発現量を低下  
させる、(ii) 機能を抑制する、(iii) 該タンパク質に対する宿主免疫応答を  
顕在化させる等の方法によって抗腫瘍活性を導くことが可能となる。これと同時  
20 に、抗原陰性と診断された患者に対しては別の治療法への切替が迅速に行えるな  
ど、患者に無用な負担をかける懸念がなくなると予想される。以上のように発現  
プロファイル解析は、癌の分子診断と分子標的治療薬の開発に多大な貢献をなし  
うるものと期待されている。

一方、FLJ20539遺伝子 (GenBank Accession No. AK000546) は、ヒト胃癌細胞  
25 株KATOIII由来のライブラリーからクローニングされた遺伝子であり、774アミノ  
酸からなるタンパク質をコードしている (GenBank Accession No. BAA91245)。  
FLJ13515遺伝子 (GenBank Accession No. AK023577) は、ヒト胎盤由来のライブ  
ラリーからクローニングされた遺伝子であり、639アミノ酸からなるタンパク質  
をコードしている (GenBank Accession No. BAB14613)。このタンパク質は、

FLJ20539遺伝子によってコードされるタンパク質の136番目から774番目までのアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有しているが、440番目のアミノ酸はグルタミン酸からリジンに置換されている。さらに、これら2種類のヒト遺伝子に相同性を示すマウス遺伝子 (GenBank Accession No. BC006896) がマウス乳癌組織由来のライブラリーからクローニングされており、1018アミノ酸からなるタンパク質をコードしている (GenBank Accession No. AAH06896) 。このマウス遺伝子はFLJ13515遺伝子に対して塩基配列で約83%、アミノ酸配列で約86%の相同性を有している。

癌細胞に特異的に発現する分子を標的とし、癌細胞の増殖阻害を誘導する安全な薬剤が切望されている。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、癌組織で発現が顕著に増加する遺伝子を見出した。この知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：4、配列番号：7、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(2) 配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(3) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(4) 上記(1)記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(5) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド、

(6) 配列番号：5、配列番号：8、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される

塩基配列を含有する上記（５）記載のポリヌクレオチド、

（７） 配列番号：１６、配列番号：１８、配列番号：２１、配列番号：２３、  
配列番号：２６または配列番号：２８で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

５ （８） 上記（４）記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

（９） 上記（８）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

（１０） 上記（９）記載の形質転換体を培養し、上記（１）記載のタンパク質  
またはその部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする上記（１）記載  
のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩の製造法、

１０ （１１） 上記（１）記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩  
を含有してなる医薬、

（１２） 上記（４）記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

（１３） 上記（４）記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

（１４） 上記（１）記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩

１５ に対する抗体、

（１４ａ） 癌の予防・治療作用を有する上記（１４）記載の抗体、

（１４ｂ） アポトーシス促進活性を有する上記（１４）記載の抗体、

（１４ｃ） 癌細胞のアポトーシス促進活性を有する上記（１４）記載の抗体、

（１５） 上記（１４）記載の抗体を含有してなる医薬、

２０ （１６） 上記（１４）記載の抗体を含有してなる診断薬、

（１７） 上記（４）記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な  
塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、

（１８） 上記（１７）記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医  
薬、

２５ （１９） 上記（１４）記載の抗体を用いることを特徴とする上記（１）記載の  
タンパク質の定量方法、

（２０） 上記（１９）記載の定量方法を用いることを特徴とする上記（１）記  
載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断方法、

（２１） 上記（１）記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩



を用いることを特徴とする、上記（１）記載のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２２） 上記（１）記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記（１）記載のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（２３） 上記（２１）記載のスクリーニング方法または上記（２２）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（１）記載のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、

（２４） 上記（４）記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２５） 上記（４）記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（２６） 上記（２４）記載のスクリーニング方法または上記（２５）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、

（２７） 上記（２３）または上記（２６）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（２８） 配列番号：１または配列番号：１０で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、

（２９） 上記（２８）記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

（３０） 上記（２８）記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

（３１） 配列番号：１または配列番号：１０で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチド

ドまたはその塩に対する抗体、

(32) 上記(31)記載の抗体を含有してなる医薬、

(33) 上記(31)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(34) 配列番号：1または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

(35) 癌の予防・治療剤である上記(11)、(12)、(15)、(18)、(27)、(29)または(32)記載の医薬、

(35a) 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍である上記(35)記載の医薬、

(35b) 乳癌または肺癌の予防・治療剤である上記(32)記載の医薬、

(36) 癌の診断薬である上記(13)、(16)、(30)、(33)または(34)記載の診断薬、

(36a) 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍である上記(36)記載の診断薬、

(37) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(38) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(39) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：2

5 または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法、

5 (40) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25 または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット、

10 (41) 上記(39)記載のスクリーニング方法または上記(40)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤、

15 (42) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25 または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法、

20 (43) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25 または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット、

(44) 上記(42)記載のスクリーニング方法または上記(43)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤、

25 (45) アポトーシス促進剤である上記(11)、(12)、(15)、(18)、(27)、(29)または(32)記載の医薬、

(45a) 癌細胞のアポトーシス促進剤である上記(11)、(12)、(15)、(18)、(27)、(29)または(32)記載の医薬、

(46) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25

5 または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法、

5 (47) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法、

10 (48) 哺乳動物に対して、(i) 上記(14)もしくは上記(31)記載の抗体、(ii) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または(iii) 該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法、

20 (49) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法、

25 (50) 癌の予防・治療剤を製造するための、(i) 上記(14)もしくは上記(31)記載の抗体、(ii) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または(iii) 該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の使用などを提供する。

### 図面の簡単な説明

図1は、T A C T 4 2 7 - A の疎水性プロットを表す図である。

図2は、T A C T 4 2 7 - A 2 の疎水性プロットを表す図である。

5 図3は、T A C T 4 2 7 - B の疎水性プロットを表す図である。

図4は、T A C T 4 2 7 - 2 B の疎水性プロットを表す図である。

図5は、T A C T 4 2 7 - C の疎水性プロットを表す図である。

図6は、T A C T 4 2 7 - C 2 の疎水性プロットを表す図である。

### 10 発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例  
15 えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、  
20 視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 5 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 10 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、配列番号：4で表されるアミノ酸配列の47番目から296番目のアミノ酸配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列なども挙げられる。

15 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 20 配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、配列番号：7で表されるアミノ酸配列の577番目から594番目のアミノ酸配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列なども挙げられる。

25 配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を

含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：10で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：10で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：10で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：10で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：15で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、配列番号：15で表されるアミノ酸配列の47番目から296番目のアミノ酸配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列なども挙げられる。

配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：17で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：17で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、配列番号：17で表されるアミノ酸配列の43番目から292番目のアミノ酸配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列なども挙げられる。

配列番号：１７で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：１７で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１７で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：２０で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：２０で表されるアミノ酸配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、配列番号：２０で表されるアミノ酸配列の４７番目から２９６番目のアミノ酸配列に対して約７０％以上、好ましくは約８０％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列なども挙げられる。

配列番号：２０で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：２０で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：２０で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：２２で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：２２で表されるアミノ酸配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、配列番号：２２で表されるアミノ酸配列の４３番目から２９２番目のアミノ酸配列に対して約７０％以上、好ましくは約８０％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列なども挙げられる。

配列番号：２２で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：２２で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：２２で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。



配列番号：25で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：25で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、配列番号：25で表されるア

5 アミノ酸配列の47番目から296番目のアミノ酸配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列なども挙げられる。

配列番号：25で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：25で表されるアミノ酸配

10 列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：25で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：27で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：27で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性

15 を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、配列番号：27で表されるアミノ酸配列の43番目から292番目のアミノ酸配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列なども挙げられる。

配列番号：27で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：27で表されるアミノ酸配

20 列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：27で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

25 アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件(期待値=10; ギャップを許す; マトリクス=BLOSUM62; フィルタリング=OFF)にて計算することができる。

実質的に同質の活性としては、例えば、クロロパーオキシダーゼ活性などが挙

げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に、(例、生理学的に、または薬理学的に) 同質であることを示す。したがって、クロロパーオキシダーゼ活性が同等 (例、約 0.01 ~ 100 倍、好ましくは約 0.1 ~ 10 倍、より好ましくは 0.5 ~ 2 倍) であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

クロロパーオキシダーゼ活性の測定は、公知の方法に準じて行えばよく、例えば、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.) 241 巻、1763~1768 頁 (1966 年) などに記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

- 10 また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、(i) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25 または配列番号：27 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (例えば 1 ~ 100 個程度、好ましくは 1 ~ 30 個程度、好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数 (1 ~ 5) 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25 または配列番号：27 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (例えば 1 ~ 100 個程度、好ましくは 1 ~ 30 個程度、好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数 (1 ~ 5) 個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25 または配列番号：27 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (例えば 1 ~ 100 個程度、好ましくは 1 ~ 30 個程度、好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数 (1 ~ 5) 個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25 または配列番号：27 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (例えば 1 ~ 100 個程度、好ましくは 1 ~ 30 個程度、好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数 (1 ~ 5) 個) のアミノ酸が他のアミノ酸で

置換されたアミノ酸配列、または (v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

- 5      本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。
- 10

- ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。
- 15

- 本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステル
- 20
- としては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内
- 25
- のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：17で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：20で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：22で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：25で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：27で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

- 10 本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

- 20 また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

25 また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられる

タンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシ基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロ

キシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、  
4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、  
4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル) フェノキシ樹  
脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能  
5 基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知  
の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質  
または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液  
中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分  
ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

- 10 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活  
性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイ  
ミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチ  
ル-N'- (3-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが用いられる。  
これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤 (例えば、HOBt, HOOBt)  
15 とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHO  
BtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性  
化を行なった後に樹脂に添加することができる。

- 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質  
縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、  
20 N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピ  
ロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化  
水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドな  
どのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテ  
ル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸  
25 エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応  
温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜  
選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたア  
ミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いた  
テストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応

を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

5 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

10 カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジル  
15 エステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低  
20 級（C<sub>1-6</sub>）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-  
25 Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水

物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料の  
5 アミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、  
10 ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱  
15 保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

25 タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプ



チドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(i)～(v)に記載された方法が挙げられる。

(i) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(ii) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(iv) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられ

る部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

- 5      本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。
- 10      ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。
- 15      本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、
- (i) 配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、
- 20      (ii) 配列番号：5で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：5で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、
- (iii) 配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：
- 25      8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、
- (iv) 配列番号：11で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：11で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

塩基配列を含有し、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

(v) 配列番号：16で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：

16で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

5 塩基配列を含有し、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

(vi) 配列番号：18で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：

18で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

10 塩基配列を含有し、配列番号：17で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

(vii) 配列番号：21で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番

号：21で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズ

する塩基配列を含有し、配列番号：20で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

15 (viii) 配列番号：23で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番

号：23で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズ

する塩基配列を含有し、配列番号：22で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

(ix) 配列番号：26で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：

20 26で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

塩基配列を含有し、配列番号：25で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

(x) 配列番号：28で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：

28で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

25 塩基配列を含有し、配列番号：27で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と約7

0%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

5 配列番号：5で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：5で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。例えば、配列番号：5で表される塩基配列の139番目から888番目の塩基配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなども用いられる。

10 配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：8で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。例えば、配列番号：8で表される塩基配列の1728番目から1782番目の塩基配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなども用いられる。

20 配列番号：11で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：11で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

25 配列番号：16で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：16で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：18で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブ

リダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：18で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 5 配列番号：21で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：21で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 10 配列番号：23で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：23で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 15 配列番号：26で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：26で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 20 配列番号：28で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：28で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 25 塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; フィルタリング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。
- ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例え

ば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

より具体的には、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：3 で表される塩基配列を含有する DNA などが、

(ii) 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：5 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：6 で表される塩基配列を含有する DNA などが、

(iii) 配列番号：7 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：8 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：9 で表される塩基配列を含有する DNA などが、

(iv) 配列番号：10 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：11 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：12 で表される塩基配列を含有する DNA などが、

(v) 配列番号：15 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：16 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：19 で表される塩基配列を含有する DNA などが、

(vi) 配列番号：17 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：18 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：19 で表される塩基配列を含有する DNA などが、

(vii) 配列番号：20 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：21 で表される塩基配列を含有する DNA また

は配列番号：24で表される塩基配列を含有するDNAなどが、

(viii) 配列番号：22で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：23で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：24で表される塩基配列を含有するDNAなどが、

5 (ix) 配列番号：25で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：26で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：29で表される塩基配列を含有するDNAなどが、

(x) 配列番号：27で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：28で表される塩基配列を含有するDNAまたは  
10 配列番号：29で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・  
15 組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される塩基配列を含有するDNAの一部分を有するDNA、または  
20 配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNAなどが用いられる。

25 配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同

様のものが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段として、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km (宝酒造 (株))、Mutan<sup>TM</sup>-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110,



pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、  
λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、  
バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

5       本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

10       これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

15       発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。

25       特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

      また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配

列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- 10 エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60 巻,160(1968)] , JM103 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)] , JA221 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)] , HB101 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)] , C600 [Genetics, 39 15 巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [Gene, 24巻, 255(1983)] , 207-21 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

- 20 酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20 B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71などが用いられる。

- 25 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC

CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L.ら、In Vivo, 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、Nature, 315巻, 592(1985)〕。

5 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, マウスATDC5細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

10 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110(1972)やGene, 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

15 酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

20 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267(1995)(秀潤社発行)、Virology, 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

25 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カ

ゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

- 5 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

- 10 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 15 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330(1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 20 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 25 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔Science, 122巻, 501(1952)〕, DME M培地〔Virology, 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1(1950)〕

などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

- 5      上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したの  
10      ち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- 15      このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラ  
20      フィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 25      かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的

に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

- 5   かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウェスタンブロッティングなどにより測定することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

- 10   本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

- 15   (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。

- 20   用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 25   モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミ

ルスタインの方法〔Nature、256、495（1975）〕に従い実施することができる。  
融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

5 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

10 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを  
15 加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行  
20 なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あ  
25 るいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。



抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

- 5      本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある））の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の塩基配列に相補的
- 10      的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよく、アンチセンスDNAが好ましい。

- 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは
- 15      部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、（イ）翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補
- 20      鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが、
- （ロ）RNase HによるRNA分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約
- 25      95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される塩基配列を含有するDNAの塩基配列

に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相

同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パインドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-ラージンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例

えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核

5 酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

20 こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

25 本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を

高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは

- 5 5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリ
- 10 リコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

15

- 以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の
- 20 抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

- 本発明のタンパク質は、癌組織で発現が増加するので、疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、癌組織における早期診断、症状の重症度の判定、
- 25 疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。よって、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩、または本発明のタンパク質に対する抗体を含有する医薬は、例えば、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、

肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤（好ましくは、乳癌、肺癌などの予防・治療剤）、癌細胞のアポトーシス促進剤として使用することができる。

5 (1) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は癌組織で発現が亢進してしており、さらに、本発明のタンパク質の活性（例、クロロパーオキシダーゼ活性）を阻害すると癌細胞がアポトーシスを起こす。従って、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、乳癌、肺癌などの予防・治療剤である。また、本発明のタンパク質の活性（例、クロロパーオキシダーゼ活性）を阻害する化合物またはその塩は、例えば、癌細胞のアポトーシス促進剤として使用することもできる。

10 したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

20 具体的には、例えば、(i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞のクロロパーオキシダーゼ活性と、(ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物のクロロパーオキシダーゼ活性とを比較することを特徴する本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法が用いられる。

25 上記スクリーニング方法においては、例えば、(i) と (ii) の場合において、クロロパーオキシダーゼ活性を測定し、monochlorodimedoneに塩素を付加して、dichlorodimedoneを生成する活性を指標として比較する。

クロロパーオキシダーゼ活性は、公知の方法、例えば、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.) 241巻、1763頁～1768頁 (1966

年) 記載の方法に従って測定する。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、COS 7細胞、CHO細胞、HEK 293細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

例えば、上記(ii)の場合における本発明のタンパク質のクロロパーオキシダーゼ活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のタンパク質の活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質の遺伝子も、癌組織において発現が増加するので、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩も、例えば乳癌、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、乳癌、肺癌などの予防・治療剤である。また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、癌細胞のアポトーシス促進剤として使

用することもできる。

したがって、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）は、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

- 5      スクリーニング方法としては、(iii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、(iv) 試験化合物の存在下、本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合との比較を行うことを特徴とするスクリーニング方法が挙げられる。

- 10      上記方法において、(iii) と (iv) の場合における、前記遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量）を測定して、比較する。

試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

- 15      タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

- 20      mRNA量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるPCR法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。
- 25

例えば、上記(iv) の場合における遺伝子の発現を、上記(iii) の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物として選択することができる。



本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

5 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩である。

10 該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩はそれぞれ、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀  
15 胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の治療・予防剤（好ましくは、乳癌、肺癌などの予防・治療剤）として、または癌細胞のアポトーシス促進剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従っ  
20 て製剤化することができる。

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用  
25 いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節

内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記化合物またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、5 適切な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol adduct of hydrogenated castor oil) ) 〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、10 ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適切なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記化合物またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、15 それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg、とりわけ注射剤では 5～100 mg、その他の剤形では 10～250 mg の上記化合物が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記化合物との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。20

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

25 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物またはその塩を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～2

0 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重 60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約 0.01 ~ 30 mg、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg を癌病変部に注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

## (2) 本発明のタンパク質の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質の N 端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質の C 端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の  $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは  $F a b$  画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗

原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点  
5 で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グル  
10 ルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にピオチン-アビジン系を用いること  
15 もできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、ある  
20 いはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応  
25 は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の増加が検出された場合、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

### (3) 遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク

質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

- 5      本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第8  
10      6巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

- 例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異などが検出された場合は、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌で  
15      ある可能性が高いと診断することができる。

#### （4）アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

- 本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能や作用を抑制することができるので、例  
20      えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、乳癌、肺癌などの癌の予防・治療剤である。また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは例えば、  
25      癌細胞のアポトーシス促進剤として使用することもできる。

    上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤、促進剤などとして使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

    また、例えば、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエेटドウィ

イルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポソームなどの担体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下等に投与してもよい。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明の遺伝子の発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑制することができるので、例えば、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤（好ましくは、乳癌、肺癌などの予防・治療剤）、癌細胞のアポトーシス促進剤などとして使用することができる。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁,



2001年) に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分(RNA断片)が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

#### (5) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明の抗体は、癌細胞の増殖阻害作用あるいはアポトーシス促進作用を有し、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤(例、ワクチンなど)として使用することができる。好ましくは、乳癌、肺癌などの予防・治療剤である。また、本発明の抗体は、例えば、癌細胞のアポトーシス促進剤として使用することもできる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤、促進剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的(例、血管内投与、皮下投与など)に投与することができる。好ましくはワクチンとして定法に従って投与することができる。

本発明の抗体は、それ自体を投与しても良いし、または適当な医薬組成物として投与しても良い。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明の抗体およびその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであっても良い。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤、ワクチン等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調整できる。注射剤の調整方法としては、例えば、上記本発明の抗体またはその塩を通

常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、  
5 ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されても良い。

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。この  
15 ような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形  
20 としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤(アンプル)、坐剤が挙げられる。抗体の含有量としては、投薬単位剤形当たり通常 5~500mg 程度、とりわけ注射剤では 5~100mg 程度、その他の剤形では 10~250mg 程度の上記抗体が含有されていることが好ましい。

本発明の抗体を含有する上記予防・治療剤、調節剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の乳癌の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を 1 回量として、通常 0.01~20mg/kg 体重程度、好ましくは 0.1~10mg/kg 体重程度、さらに好ましくは 0.1~5mg/kg 体重程度を、1 日 1~5 回程度、好ましくは 1 日 1~3 回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投

与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、  
5 経口または非経口投与（例、血管内注射、皮下注射など）に適する剤形として提供される。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

10

#### （６）本発明のタンパク質を含有する医薬

本発明のタンパク質は癌で過剰に発現していることから、癌患者の免疫系を活性化するために本発明のタンパク質を癌ワクチンとして用いることもできる。

例えば、強力な抗原提示細胞（例、樹状細胞）を本発明のタンパク質存在下に  
15 培養し、該タンパク質を貪食させた後に、再び患者の体内に戻す、所謂養子免疫療法などを好ましく適用し得る。体内に戻された樹状細胞は癌抗原特異的な細胞障害性Ｔ細胞を誘導、活性化することにより癌細胞を死滅させることが可能である。

また、本発明のタンパク質は、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、  
20 胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防または治療のためのワクチン製剤として、安全に、哺乳動物（例、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ブタ）に投与することもできる。

該ワクチン製剤は、通常、本発明のタンパク質および生理学的に許容されうる  
25 担体を含有する。担体としては例えば、水、食塩水（生理食塩水を含む）、緩衝液（例、リン酸緩衝液）、アルコール（例、エタノール）などの液体の担体あげられる。

ワクチン製剤は、通常のワクチン製剤の製造方法に従って調製することができる。

通常、本発明のタンパク質は、生理学的に許容されうる担体に溶解または懸濁される。また、本発明のタンパク質と生理学的に許容されうる担体とを別々に調製し、用時それらを混合して用いてもよい。

ワクチン製剤には、本発明のタンパク質および生理学的に許容されうる担体に  
5 加え、アジュバント（例、水酸化アルミニウムゲル、血清アルブミンなど）、防腐剤（例、チメロサルなど）、無痛化剤（例、ブドウ糖、ベンジルアルコールなど）などを配合させてもよい。また、本発明のタンパク質に対する抗体産生を促進させるために、例えばサイトカイン（例、インターロイキン-2などのインターロイキン類、インターフェロン- $\gamma$ などのインターフェロン類など）をさら  
10 に配合させてもよい。

ワクチン製剤として用いる際、本発明のタンパク質は活性体として用いてもよいが、抗原性を高めるために本発明のタンパク質を変性させてもよい。本発明のタンパク質の変性は、通常、加熱処理、タンパク変性剤（例、ホルマリン、塩酸グアニジン、尿素）による処理により行われる。

15 得られたワクチン製剤は低毒性であり、通常注射剤として、例えば皮下、皮内、筋肉内に投与してもよく、また癌細胞塊またはその近傍に局所的に投与してもよい。

本発明のタンパク質の投与量は、例えば対象疾患、投与対象、投与ルートなどによって異なるが、例えば本発明のタンパク質を癌に罹患した成人（体重60 kg）に皮下的に注射剤として投与する場合、1回当たり通常0.1 mg～300 mg程度、好ましくは100 mg～300 mg程度である。ワクチン製剤の投与回数は1回でもよいが、抗体産生量を高めるために、約2週間～約6ヶ月の間隔をあけて、該ワクチン製剤を2～4回投与することもできる。

## 25 (7) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、  
(2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、  
(3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および  
(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において  
5 発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、  
本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始  
原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生におけ  
る胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般  
10 に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、  
凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキス  
トラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することがで  
きる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目  
的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用するこ  
15 ともでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により  
融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、  
ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、  
病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、ま  
20 た、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系  
統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例  
えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、  
25 上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNA  
ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、  
突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置

換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

5 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物  
10 物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

15 本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、入フェージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。  
20

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i) ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、JCウィルス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(ii) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、  
25 筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$  Iサ

ブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

15 上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

20 その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

25 正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞ま

たは組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。



また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタ

ンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質または機能不活性型不応症に対する予防・治療剤、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記２種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

(i) 組織培養のための細胞源としての使用、

(ii) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、

(iii) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

(iv) 上記 (iii) 記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(v) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性

型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質に関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### (8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

(2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、

(3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、

(4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、

(5) ゲッ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、

(6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、

(7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNA

に対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、

(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、

(9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および

(10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現

能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

5 本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

10 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、  
15 あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、  
20 例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を  
25 選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免

疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

- 10      また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

- 15      また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

- 20      ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

- 25      また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例え

ば、S T O 繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF (1~10000 U/ml) 存在下に炭酸ガス培養器内 (好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気) で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液 (通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA) 処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及びM. H. Kaufman, Nature 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはター

ゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

- 5  
10  
15
- 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

- 20
- 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- 25
- さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテ

ロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

5 また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(8 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

10 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば癌などに対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

15 該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

20 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

25 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。



例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、試験化合物非投与群と癌の発症度合いの違いや癌の治癒度合いの違いを上記組織で経時的に観察する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどによ

り差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重 60 kg として）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg、好ましくは約 0.1～20 mg、より好ましくは約 0.1～10 mg を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

10 (8b) 本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

15 本発明は、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

20 上記スクリーニング方法において、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明の DNA がレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明の DNA に対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

25 本発明の DNA をレポーター遺伝子で置換された本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明の DNA に対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードする DNA 領域の一部を大腸菌由来の  $\beta$

ーガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド (X-gal) のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、アルカリ金属など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の阻害、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

5      このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

10      該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

20      このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

25      また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

5	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
10	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
15	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
20	EGTA	: エチレングリコール-ビス- (ベータアミノエチルエーテル) 四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
25	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン

	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
5	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
10	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
15	S e c	: セレノシステイン (selenocysteine)

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	M e	: メチル基
20	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
25	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル
	C l <sub>2</sub> -B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル

	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェニル
5	T r t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
10		1,2,3-ベンゾトリアジン
	H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

15 [配列番号：1]

FLJ20539のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するFLJ20539をコードするDNAの塩基配列を示す。

20 [配列番号：3]

FLJ20539をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：4]

hCP50177のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：5]

25 配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するhCP50177のDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：6]

hCP50177の全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：7]

h C P 1 7 6 2 3 1 9 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：8〕

配列番号：7 で表されるアミノ酸配列を有する h C P 1 7 6 2 3 1 9 の DNA の塩基配列を示す。

5      〔配列番号：9〕

h C P 1 7 6 2 3 1 9 の全長遺伝子を含む DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

F L J 1 3 5 1 5 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕

10      配列番号：10 で表されるアミノ酸配列を有する F L J 1 3 5 1 5 をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

F L J 1 3 5 1 5 をコードする全長遺伝子を含む DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

15      実施例 2、実施例 19、実施例 20 および実施例 21 で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

実施例 2、実施例 19、実施例 20 および実施例 21 で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

20      〔配列番号：15〕

T A C T 4 2 7 - A のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

配列番号：15 で表されるアミノ酸配列を有する T A C T 4 2 7 - A をコードする DNA の塩基配列を示す。

25      〔配列番号：17〕

T A C T 4 2 7 - A 2 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

配列番号：17 で表されるアミノ酸配列を有する T A C T 4 2 7 - A 2 をコードする DNA の塩基配列を示す。



〔配列番号：19〕

TACT427-AおよびTACT427-A2をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

- 5 TACT427-Bのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：21〕

配列番号：20で表されるアミノ酸配列を有するTACT427-BをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

- 10 TACT427-B2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：23〕

配列番号：22で表されるアミノ酸配列を有するTACT427-B2をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

- 15 TACT427-BおよびTACT427-B2をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

TACT427-Cのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：26〕

- 20 配列番号：25で表されるアミノ酸配列を有するTACT427-CをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

TACT427-C2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：28〕

- 25 配列番号：27で表されるアミノ酸配列を有するTACT427-C2をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

TACT427-CおよびTACT427-C2をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

実施例3で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

実施例3で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：32〕

実施例4で用いられたプライマー3の塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

実施例4で用いられたプライマー4の塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

10 実施例5で用いられたプライマー5の塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

実施例5で用いられたプライマー6の塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

15 実施例6、実施例7、実施例8、および実施例20で用いられたプライマー7の塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

実施例6、実施例7、実施例8、および実施例20で用いられたプライマー8の塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

20 実施例6、実施例7、実施例8、および実施例20で用いられたTaqManプローブ1の塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

実施例10で用いられたプライマー9の塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

25 実施例10で用いられたプライマー10の塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

実施例11で用いられたペプチド1のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：42〕

実施例11で用いられたペプチド2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：43〕

実施例11で用いられたペプチド3のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：44〕

5 実施例19、実施例20および実施例21で用いられたセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

10 後述の実施例4で得られた形質転換体*Escherichia coli* TOP10/47427A/pCR-BluntII-TOP0は、2002年12月3日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8253として寄託されている。

後述の実施例4で得られた形質転換体*Escherichia coli* TOP10/47427B/pCR-BluntII-TOP0は、2002年12月3日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8254として寄託されている。

15 後述の実施例5で得られた形質転換体*Escherichia coli* TOP10/47427C/pCR-BluntII-TOP0は、2002年12月3日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8255として寄託されている。

20 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラークローニング (Molecular cloning, 2<sup>nd</sup>, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989年)に記載されている方法に従った。

## 25 【実施例1】

### 遺伝子発現解析

乳癌組織および肺癌組織で特異的に発現亢進している遺伝子群を明らかにするため、乳癌組織8例、正常乳房組織4例から抽出されたtotal RNA（表1）、および肺癌組織4例、正常肺組織5例から抽出されたtotal RNA（表3）を材料とし、

oligonucleotide microarray (Human Genome U95A, U95B, U95C, U95D, U95E; Affymetrix社) を用いて遺伝子発現解析を行った。

実験方法は、Affymetrix社の実験手引き書 (Expression analysis technical manual) に従った。その結果、乳癌組織 (lot.0009-192-00101、lot.0009-192-00120、lot.0009-192-00153、lot.0009-192-00178) および肺癌組織 (lot.0009-192-00122、lot.0011-192-01293、lot.0011-192-01297) においてそれぞれ正常乳房組織、正常肺組織に比べ、(1) FLJ20539遺伝子 (配列番号：2)、FLJ20539関連遺伝子であるhCP50177遺伝子 (配列番号：5)、FLJ20539関連遺伝子であるhCP1762319遺伝子 (配列番号：8) ならびにFLJ13515遺伝子 (配列番号：11)、および(2) 後述の実施例4または実施例5で得られたTACT427-A遺伝子 (配列番号：16)、TACT427-A2遺伝子 (配列番号：18)、TACT427-B遺伝子 (配列番号：21)、TACT427-B2遺伝子 (配列番号：23)、TACT427-C遺伝子 (配列番号：26) ならびにTACT427-C2遺伝子 (配列番号：28) の発現亢進が検出された (表2および表4)。

〔表1〕

	RNAを抽出した組織	販売元
	乳がん組織 (lot.0009-192-00101)	BioClinical Partners 社
	乳がん組織 (lot.0009-192-00120)	BioClinical Partners 社
20	乳がん組織 (lot.0009-192-00153)	BioClinical Partners 社
	乳がん組織 (lot.0009-192-00155)	BioClinical Partners 社
	乳がん組織 (lot.0009-192-00157)	BioClinical Partners 社
	乳がん組織 (lot.0009-192-00178)	BioClinical Partners 社
	乳がん組織 (lot.0011-192-01284)	BioClinical Partners 社
25	乳がん組織 (lot.0011-192-01287)	BioClinical Partners 社
	正常乳房組織 (lot.0008-192-00404)	BioClinical Partners 社
	正常乳房組織 (lot.0008-192-00422)	BioClinical Partners 社
	正常乳房組織 (lot.0009-192-00153)	BioClinical Partners 社
	正常乳房組織 (lot.0011-192-01286)	BioClinical Partners 社

〔表 2〕

	組織	遺伝子発現量
	乳がん組織 (lot.0009-192-00101)	3.7
	乳がん組織 (lot.0009-192-00120)	9.0
5	乳がん組織 (lot.0009-192-00153)	2.1
	乳がん組織 (lot.0009-192-00155)	ND
	乳がん組織 (lot.0009-192-00157)	0.54
	乳がん組織 (lot.0009-192-00178)	2.1
	乳がん組織 (lot.0011-192-01284)	ND
10	乳がん組織 (lot.0011-192-01287)	ND
	正常乳房組織 (lot.0008-192-00404)	ND
	正常乳房組織 (lot.0008-192-00422)	ND
	正常乳房組織 (lot.0009-192-00153)	1.6
	正常乳房組織 (lot.0011-192-01286)	1.2
15	遺伝子発現量は、oligonucleotide microarrayで発現が 検出された全遺伝子の発現量の中央値を1として標準化した。 ND; not detected	

〔表 3〕

	RNAを抽出した組織	販売元
20	肺がん組織 (lot.0009-192-00122)	BioClinical Partners 社
	肺がん組織 (lot.0011-192-01285)	BioClinical Partners 社
	肺がん組織 (lot.0011-192-01293)	BioClinical Partners 社
	肺がん組織 (lot.0011-192-01297)	BioClinical Partners 社
25	正常肺組織 (lot.0009-192-00150)	BioClinical Partners 社
	正常肺組織 (lot.0009-192-00168)	BioClinical Partners 社
	正常肺組織 (lot.0011-192-01283)	BioClinical Partners 社
	正常肺組織 (lot.0011-192-01285)	BioClinical Partners 社
	正常肺組織 (lot.0011-192-01297)	BioClinical Partners 社

〔表 4〕

組織	遺伝子発現量
肺がん組織 (lot.0009-192-00122)	2.8
肺がん組織 (lot.0011-192-01285)	0.67
5 肺がん組織 (lot.0011-192-01293)	1.3
肺がん組織 (lot.0011-192-01297)	1.5
正常肺組織 (lot.0009-192-00150)	ND
正常肺組織 (lot.0009-192-00168)	0.38
正常肺組織 (lot.0011-192-01283)	ND
10 正常肺組織 (lot.0011-192-01285)	ND
正常肺組織 (lot.0011-192-01297)	ND

遺伝子発現量は、oligonucleotide microarrayで発現が  
検出された全遺伝子の発現量の中央値を1として標準化した。

ND; not detected

15

## 【実施例 2】

ヒト肺癌細胞株のアポトーシス誘発

本発明のタンパク質遺伝子の発現を抑制することにより、ヒト肺癌細胞株のアポトーシスが誘発されるか否かを調べた。

20

まず、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H460を、RPMI-1640培地 (25mM HEPES含有) (Invitrogen社) に牛胎仔血清 (ATCC) を10%加えた培地で懸濁し、1ウェル当たり4000個の細胞密度で96穴平底組織培養プレート (BDファルコン社) に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、アンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクションした。

25

具体的には、(1) FLJ20539遺伝子 (配列番号: 2)、FLJ20539関連遺伝子であるhCP50177遺伝子 (配列番号: 5)、FLJ20539関連遺伝子であるhCP1762319遺伝子 (配列番号: 8) ならびにFLJ13515遺伝子 (配列番号: 11)、および

(2) 後述の実施例 4 または実施例 5 で得られたTACT427-A遺伝子 (配列番号: 1

- 6)、TACT427-A2遺伝子(配列番号:18)、TACT427-B遺伝子(配列番号:21)、TACT427-B2遺伝子(配列番号:23)、TACT427-C遺伝子(配列番号:26)ならびにTACT427-C2遺伝子(配列番号:28)のタンパク質コード領域配列または3'非翻訳領域にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド配列(配列番号:13)を設計後、phosphorothioate化オリゴヌクレオチドを合成し、HPLC精製して導入実験に用いた(以下、アンチセンスオリゴヌクレオチドと略する)。コントロールとしては、配列番号:13で示される塩基配列のリバーズ配列(配列番号:14)を同様にphosphorothioate化し、HPLC精製して用いた(以下、コントロールオリゴヌクレオチドと略する)。
- 10 アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはコントロールオリゴヌクレオチドを、Opti-MEM (Invitrogen社)で希釈し、さらにFuGENE6試薬 (Roche Diagnostics社)を4倍量(4 $\mu$ L/ $\mu$ gオリゴヌクレオチド)の割合で加えた混合液を室温で30分間放置した。このオリゴヌクレオチド溶液を、1ウェル当たり40 $\mu$ Lの割合でプレートに添加した。オリゴヌクレオチドの終濃度は140 nMとなるよう調整した。
- 15 上記の条件で更に3日間培養した後、Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>キット (Roche Diagnostics社)を用いて、添付プロトコルに従い上記オリゴヌクレオチドのアポトーシス誘導活性を測定した。
- その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチドは陰性対照として用いたコントロールオリゴヌクレオチドに比べ、約2.8倍のアポトーシス誘導活性を示し、統計学的に有意な差(P=0.0005)を示した(表5)。
- 20

〔表5〕

	アポトーシス誘導活性 ( $A_{405} - A_{492}$ )	
	平均値	標準偏差
ブランク	0.297	0.053
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号:14)	0.764	0.096
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号:13)	1.57	0.093

## 【実施例 3】

アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によるNCI-H460のアポトーシス誘導

アンチセンスオリゴヌクレオチド投与により、(1) FLJ20539遺伝子(配列番号: 2)、FLJ20539関連遺伝子であるhCP50177遺伝子(配列番号: 5)、

- 5 FLJ20539関連遺伝子であるhCP1762319遺伝子(配列番号: 8)ならびにFLJ13515遺伝子(配列番号: 11)、および(2)後述の実施例4または実施例5で得られたTACT427-A遺伝子(配列番号: 16)、TACT427-A2遺伝子(配列番号: 18)、TACT427-B遺伝子(配列番号: 21)、TACT427-B2遺伝子(配列番号: 23)、TACT427-C遺伝子(配列番号: 26)ならびにTACT427-C2遺伝子(配列番号: 28)の発現量が低下するか否かを調べた。

- 10 実施例2で用いたヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H460を実施例2と同じ培地に懸濁し、1ウェル当たり24,000個の細胞密度で24穴平底組織培養プレート(BDファルコン社)に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、アンチセンスオリゴヌクレオチドとコントロールオリゴヌクレオチドをトランスフェクションした。オリゴヌクレオチド溶液の添加量は1ウェル当たり390  $\mu$ Lとし、オリゴヌクレオチドの終濃度は200 nMとなるよう調整した。トランスフェクション後、
- 15 5%炭酸ガス気流中、37℃で24時間培養を継続した後にRNeasy Mini Total RNA Kit(QIAGEN社)を用いてトータルRNAを抽出した。約400 ngのトータルRNAを鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents(Applied Biosystems社)
- 20 を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応を行った。トータルRNAにして10 ngに相当するcDNAを鋳型とし、2種類のプライマー〔プライマー1(配列番号: 30)およびプライマー2(配列番号: 31)〕とSYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems社)を用いて、(1) FLJ20539遺伝子(配列番号: 2)、FLJ20539関連遺伝子であるhCP50177遺伝子(配列番号: 5)、FLJ20539関連遺伝子であるhCP1762319遺伝子(配列番号: 8)ならびにFLJ13515遺伝子(配列番号: 11)、および(2)後述の実施例4で得られたTACT427-A遺伝子(配列番号: 16)、TACT427-A2遺伝子(配列番号: 18)、TACT427-B遺伝子(配列番号: 21)、TACT427-B2遺伝子(配列番号: 23)、TACT427-C遺伝子(配列番号: 26)ならびにTACT427-C2遺伝子(配列番号: 28)の発現コピー数を測定
- 25



した。

同量の鋳型cDNA中に含まれる $\beta$ -アクチン遺伝子発現量をTaqMan  $\beta$ -actin Control Reagents (Applied Biosystems社) を用いて測定し内部標準とした。アンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクションしない場合には、上記10  
5 遺伝子の発現量は $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量の0.10%であったのに対し、配列番号：13で示されるアンチセンスオリゴヌクレオチド投与群では0.046%であり統計学的に有意 ( $P \leq 0.05$ ) な発現量低下が認められた。一方、コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号：14) 投与群では0.088%であり非トランスフェクション群と比べて統計学的に有意な発現量低下は認められなかった。この結  
10 果より、上記10遺伝子の発現量の低下によりヒト肺癌細胞株のアポトーシスが誘発されたことが示された。

#### 【実施例4】

ヒト脳由来タンパク質TACT427-A、TACT427-A2、TACT427-BおよびTACT427-B2を  
15 コードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2種のプライマー〔プライマー3 (配列番号：32) およびプライマー4 (配列番号：33)〕を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は、上記cDNA 1 $\mu$ lを鋳型として使用し、PfuTurbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) 6.25U、プライマー3 (配  
20 列番号：32) およびプライマー4 (配列番号：33) を各1.0 $\mu$ M、dNTPsを200 $\mu$ M、およびPfu Buffer (STRATAGENE社) を5 $\mu$ l加え、50 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・10秒、55 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・6分のサイクルを40回繰り返した。該PCR反応産物をPCR Purification Kit (QIAGEN社) を用いて精製した。これをZero Blunt TOPO PCRクローニングキット (Invitrogen社) の処方  
25 に従いプラスミドベクターpCR-BluntII-TOPO (Invitrogen社) ヘサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、配列番号：16および配列番号：21で表されるcDNAの塩基配列をそれぞれ得た。

配列番号：3で表されるFLJ20539全長遺伝子塩基配列の1~160番目および2483

～2755番目の塩基配列を、配列番号：16で表される塩基配列の5'端および3'端にそれぞれ付加した塩基配列を、配列番号：19に示す。

配列番号：3で表されるFLJ20539全長遺伝子塩基配列の1～160番目および2483～2755番目の塩基配列を、配列番号：21で表される塩基配列の5'端および3'端にそれぞれ付加した塩基配列を、配列番号：24に示す。

配列番号：16で表される塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをTACT427-A/pCR-BluntII-TOPOと、配列番号：21で表される塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをTACT427-B/pCR-BluntII-TOPOと名付けた。

配列番号：16で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列（配列番号：15）を含有するタンパク質をTACT427-Aと命名した。

配列番号：21で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列（配列番号：20）を含有するタンパク質をTACT427-Bと命名した。

さらに、プラスミドTACT427-A/pCR-BluntII-TOPOが導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/47427A/pCR-BluntII-TOPOと、プラスミドTACT427-B/pCR-BluntII-TOPOが導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/47427B/pCR-BluntII-TOPOとそれぞれ命名した。

TACT427-Bのアミノ酸配列（配列番号：20）では、TACT427-Aのアミノ酸配列（配列番号：15）の278番目のArgがGlnに、825番目のGluがLysに、826番目のAlaがProに、970番目のValがAlaにそれぞれ置換され、340番目のSerが欠失している。

TACT427-BをコードするDNAの塩基配列（配列番号：21）では、TACT427-AをコードするDNAの塩基配列（配列番号：16）の833番目のgがaに、1482番目のgがcに、1590番目のaがgに、2473番目のgがaに、2476番目のgがcに、2909番目のtがcにそれぞれ置換され、1015～1017番目のagcが欠失している。

TACT427-Aのアミノ酸配列の1～4番目のアミノ酸配列が欠失している配列を配列番号：17に示す。配列番号：17で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をTACT427-A2と命名する。TACT427-A2をコードするDNAの塩基配列を配列番号：18に示す。

TACT427-Bのアミノ酸配列の1～4番目のアミノ酸配列が欠失している配列を配

列番号：22に示す。配列番号：22で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をTACT427-B2と命名する。TACT427-B2をコードするDNAの塩基配列を配列番号：23に示す。

5 TACT427-AをコードするDNAの塩基配列（配列番号：16）は、ヒトでは  
FLJ20539をコードするDNAの塩基配列（配列番号：2）に最も高い相同性を示した。配列番号：16で表される塩基配列の1～138番目および889～3072番目の塩基配列に対しては、配列番号：2で表される塩基配列の1～138番目および139～2322番目の塩基配列が対応し、各部分配列において、99.3%および100%の相同性をそれぞれ示す。FLJ20539をコードするDNAの塩基配列（配列番号：2）は、  
10 TACT427-AをコードするDNAの塩基配列（配列番号：16）の139～888番目に相当する塩基配列を欠いていることより、この配列はTACT427-Aに特異的な配列である。

15 TACT427-A2、TACT427-BおよびTACT427-B2についても、TACT427-Aと同様に、FLJ20539に最も高い相同性を示し、かつ、同様な塩基置換および塩基配列の欠失を有する。

20 TACT427-Aのアミノ酸配列（配列番号：15）の735～792番目までのアミノ酸配列、TACT427-A2のアミノ酸配列（配列番号：17）の731～788番目までのアミノ酸配列、TACT427-Bのアミノ酸配列（配列番号：20）の734～791番目までのアミノ酸配列、およびTACT427-B2のアミノ酸配列（配列番号：22）の730～787番目までのアミノ酸配列は、ともにアミノ酸ドメインモチーフ検索サイト SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) での検索で、クロロパーオキシダーゼモチーフを有することからクロロパーオキシダーゼ活性を持つと考えられる。

25 TACT427-Aの疎水性プロット図を〔図1〕に、TACT427-A2の疎水性プロット図を〔図2〕に、TACT427-Bの疎水性プロット図を〔図3〕に、TACT427-B2の疎水性プロット図を〔図4〕にそれぞれ示す。

#### 【実施例5】

ヒト肺癌細胞株NCI-H522由来タンパク質TACT427-CおよびTACT427-C2をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H522 (ATCCより購入) をRPMI-1640培地 (Invitrogen社) に牛胎仔血清を10%加えた培地で培養し、RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN社) を用いてトータルRNAを抽出した。トータルRNAを鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems社) を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応しcDNAを得た。ここで得られたcDNAを鋳型とし、2種のプライマー〔プライマー5 (配列番号: 34) およびプライマー6 (配列番号: 35) 〕を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを鋳型として使用し、PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE社) 2.5 U、プライマー5 (配列番号: 34) およびプライマー6 (配列番号: 35) を各1.0  $\mu$ M、dNTPsを200  $\mu$ M、およびGC Buffer I (TaKaRa社) を10  $\mu$ l加え、20  $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、95℃・1分の後、95℃・30秒、60℃・20秒、72℃・3分のサイクルを35回繰り返した。該PCR反応産物をアガロースゲルにて電気泳動後、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN社) を用いて精製した。これをZero Blunt TOPO PCRクローニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクターpCR-BluntII-TOPO (Invitrogen社) へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、配列番号: 26で表されるcDNAの塩基配列を得た。

配列番号: 3で表されるFLJ20539全長遺伝子塩基配列の1~160番目および2483~2755番目の塩基配列を、配列番号: 26で表される塩基配列の5'端および3'端にそれぞれ付加した塩基配列を、配列番号29: に示す。

配列番号: 26で表される塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをTACT427-C/pCR-BluntII-TOPOと名付けた。

配列番号: 26で表されるDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列 (配列番号: 25) を含有するタンパク質をTACT427-Cと命名した。

プラスミドTACT427-C/pCR-BluntII-TOPOが導入された形質転換体を、Escherichia coli TOP10/47427C/pCR-BluntII-TOPOと命名した。

TACT427-Cのアミノ酸配列 (配列番号: 25) では、TACT427-Aのアミノ酸配列 (配列番号: 15) の491番目のValがMetに、825番目のGluがLysに、826番目の

AlaがProに、970番目のValがAlaにそれぞれ置換され、340番目のSerが欠失している。

TACT427-CをコードするDNAの塩基配列（配列番号：26）では、TACT427-AをコードするDNAの塩基配列（配列番号：16）の504番目のaがcに、939番目のaがgに、1471番目のgがaに、1482番目のgがcに、1590番目のaがgに、2473番目のgがaに、2476番目のgがcに、2909番目のtがcにそれぞれ置換され、1015～1017番目のagcが欠失している。

TACT427-Cのアミノ酸配列の1～4番目のアミノ酸配列が欠失している配列を配列番号：27に示す。配列番号：27で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をTACT427-C2と命名する。TACT427-C2をコードするDNAの塩基配列を配列番号：28に示す。

TACT427-CをコードするDNAの塩基配列（配列番号：26）は、ヒトではFLJ20539をコードするDNAの塩基配列（配列番号：2）に最も高い相同性を示した。配列番号：26で表される塩基配列の1～138番目および886～3069番目のDNA塩基配列に対しては、配列番号：2で表される塩基配列の1～138番目および139番目～2322番目の塩基配列が対応し、各部分配列において、99.3%および99.5%の相同性をそれぞれ示す。FLJ20539コードするDNAの塩基配列（配列番号：2）は、TACT427-C（配列番号：26）で表される139～885番目に相当するDNA塩基配列を欠いていることより、この配列は、TACT427-Cに特異的な配列である。

TACT427-C2についても、TACT427-Cと同様にFLJ20539に最も高い相同性を示し、かつ同様な塩基配列の欠失を有する。

TACT427-Cのアミノ酸配列（配列番号：25）の734～791番目までの配列およびTACT427-C2のアミノ酸配列（配列番号：27）の730～787番目までの配列は、ともにアミノ酸ドメインモチーフ検索サイトSMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)での検索でクロロパーオキシダーゼモチーフを有することからクロロパーオキシダーゼ活性を持つと考えられる。

TACT427-Cの疎水性プロット図を〔図5〕に、TACT427-Cの疎水性プロット図を〔図6〕に示す。

## 【実施例 6】

以下の実施例において、TACT427-A遺伝子（配列番号：16）、TACT427-A2遺伝子（配列番号：18）、TACT427-B遺伝子（配列番号：21）、TACT427-B2遺伝子（配列番号：23）、TACT427-C遺伝子（配列番号：26）およびTACT427-C2遺伝子（配列番号：28）をまとめてTACT427遺伝子と略記することもある。

TACT427-Aタンパク質（配列番号：15）、TACT427-A2タンパク質（配列番号：17）、TACT427-Bタンパク質（配列番号：20）、TACT427-B2タンパク質（配列番号：22）、TACT427-Cタンパク質（配列番号：25）およびTACT427-C2タンパク質（配列番号：27）をまとめてTACT427タンパク質と略記することもある。

## ヒト癌組織における遺伝子発現量の検討（その1）

ヒト癌患者組織（乳癌、肺癌、大腸癌、直腸癌、卵巢癌）由来のMatched Tumor/Normal cDNA Pair（CLONTECH社）を鋳型として、FAM標識したTaqManプローブを用いた定量的PCR反応を行うことにより、癌組織と正常組織でのFLJ20539遺伝子（配列番号：2）、hCP50177遺伝子（配列番号：5）、hCP1762319遺伝子（配列番号：8）ならびにFLJ13515遺伝子（配列番号：11）、および実施例4または実施例5で得られたTACT427遺伝子の発現量を測定した。

該反応における反応液の組成は、上記cDNA 1 $\mu$ lを鋳型として使用し、TaqMan™ Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems社）を7.5 $\mu$ l、プライマー7（配列番号：36）およびプライマー8（配列番号：37）を各0.5 $\mu$ M、TaqManプローブ1（配列番号：38）を100 nMとなるよう加え、15 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、50℃・2分、95℃・10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回繰り返した。

その結果、上記遺伝子の総量は、ヒト乳癌組織4例中2例で周辺正常組織に比べそれぞれ約7倍、約16倍の、ヒト肺癌組織3例中2例で周辺正常組織に比べそれぞれ約3倍、約2倍の、ヒト大腸癌組織5例中4例で周辺正常組織に比べそれぞれ約2倍、約8倍、約3倍、約4倍の、ヒト直腸癌組織3例中2例で周辺正常組織に比べ約10倍、約5倍の、ヒト卵巢癌組織5例中2例で周辺正常組織に比べそれぞれ約3倍、

約20倍の発現量を示した。

これより、上記遺伝子の総量は、癌組織において顕著に発現上昇していることがわかる。

## 5 【実施例 7】

ヒト癌組織における遺伝子発現量の検討（その2）

ヒト肺癌組織（Direct Clinical Access社、およびBioClinical Partners社より購入）より調製したcDNAを鋳型として実施例6と同様の方法により、癌組織、および正常組織における実施例6で用いた遺伝子の発現量の比較を行った。

- 10 該反応における反応液の組成は上記cDNA 1 $\mu$ lを鋳型として使用し、実施例6と同一条件でPCR反応を行った。並行してTaqMan™ Human  $\beta$ -actin Control Reagents（Applied Biosystems社）を用いて上記cDNA 1 $\mu$ lに含まれる $\beta$ -アクチン遺伝子のコピー数を算出し内部標準とした。 $\beta$ -アクチン遺伝子発現量で標準化した場合、上記遺伝子の総量は、Direct Clinical Access社のサンプルでは、
- 15 正常肺組織に比べてヒト肺癌組織10例中8例で約144倍、約3倍、約5倍、約4倍、約4倍、約13倍、約3倍、約19倍に増加しており、ヒト肺癌組織における顕著な発現上昇がみられた。

- また、BioClinical Partners社のサンプルでは、上記遺伝子の総量が $\beta$ -アクチン遺伝子発現量の1%を超えるものが、正常肺組織では7例中1例であったのに
- 20 対し、ヒト肺癌組織では11例中5例と高頻度に認められた。

これより、上記遺伝子がヒト肺癌組織において顕著に発現上昇していることが示された。

## 【実施例 8】

- 25 ヒト培養細胞株における遺伝子発現量の検討

以下で使用される脳腫瘍細胞株SK-N-MC、SK-N-AS、SK-N-BE、SK-N-DZ、SK-N-FI、SK-N-SH、D341 Med、Daoy、DBTRG-05MG、U-118 MG、U-87 MG、CCF-STTG1およびSW 1088；ヒト乳癌細胞株HCC1937、ZR-75-1、AU565、MCF-7およびMDA-MB-231；ヒト大腸癌細胞株Caco-2、COLO 201、COLO 205、COLO 320DM、HCT-8、HT-

29、LoVo、LS123、SNU-C1、SK-CO-1、SW 403、SW 48、SW 480、SW 620、SW 837  
およびSW 948；ヒト胎児腎臓細胞株HEK293；ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H187、  
NCI-H378、NCI-H526、NCI-H889、NCI-H1672、NCI-H1836、NCI-H2227、NCI-N417  
およびSHP-77；ヒト非小細胞肺癌細胞株A549、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H358、  
5 NCI-H460、NCI-H522、NCI-H661、NCI-H810、NCI-H1155、NCI-H1299、NCI-H1395、  
NCI-H1417、NCI-H1435、NCI-H1581、NCI-H1651、NCI-H1703、NCI-H1793、NCI-  
H1963、NCI-H2073、NCI-H2085、NCI-H2106、NCI-H2228、NCI-H2342およびNCI-  
H2347；ヒト卵巣癌細胞株ES-2、Caov-3、MDAH2774、NIH:OVCAR3、OV-90、SK-OV-  
3、TOV-112DおよびTOV-21G；ヒト膵臓癌細胞株PANC-1、MIA-PaCa-2、AsPC-1、  
10 BxPC-3、Capan-1およびCapan-2；ヒト前立腺癌細胞株DU 145；ヒト網膜芽腫細胞  
株WERI-Rb-1およびY79；ヒト精巣癌細胞株Cates-1Bの86株は、ATCCより購入し  
た。ヒト正常気道上皮細胞SAECおよびヒト正常前立腺上皮細胞HPRECは、  
Clonetics社より購入した。ヒト大腸癌細胞株COCM1、ヒト非小細胞肺癌細胞株  
VMRC-LCDおよびヒト前立腺癌細胞株PC3は、JCRBより購入した。これら細胞株は  
15 実施例9以降の実施例でも用いることがある。

上記記載の細胞株91株よりRNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN社) を用いて  
トータルRNAを調製した。このトータルRNAを鋳型としてTaqMan Reverse  
Transcription Reagents (Applied Biosystems社) の添付プロトコールに従い、  
ランダムプライマーを用いた逆転写反応でcDNAを調製した。このcDNAを鋳型とし  
て定量的PCR反応を行うことにより、遺伝子FLJ20539遺伝子（配列番号：2）、  
20 hCP50177遺伝子（配列番号：5）、hCP1762319遺伝子（配列番号：8）ならびに  
FLJ13515遺伝子（配列番号：11）、およびTACT427遺伝子の発現量の検討を行  
った。

該反応は上記トータルRNA 5 ngより得られたcDNAを鋳型として使用し、実施例  
25 6と同様の方法により行った。並行してTaqMan™ Human  $\beta$ -actin Control  
Reagents (Applied Biosystems社) を用いて上記トータルRNA 1 ngに含まれる  
 $\beta$ -アクチン遺伝子のコピー数を算出し内部標準とした。

上記遺伝子全体の発現量を、 $\beta$ -アクチン遺伝子発現量で標準化した相対的発  
現率を〔表6〕に示す。



上記遺伝子発現量の総量が $\beta$ -アクチン遺伝子発現量の1%を超える癌細胞株が13株見出され、上記遺伝子の癌細胞株における高発現が認められた。

〔表6〕

細胞株	% of $\beta$ -actin	細胞株	% of $\beta$ -actin	細胞株	% of $\beta$ -actin
SK-N-MC	0.47	COLO 201	0.15	NCI-H889	0.63
SK-N-AS	0.8	COLO 205	0.07	NCI-H1672	1.61
SK-N-BE	1.14	COLO 320DM	0.97	NCI-H1836	0.58
SK-N-DZ	1.69	HCT-8	0.66	NCI-H2227	1.28
SK-N-FI	0.85	HT-29	0.21	NCI-N417	0.42
SK-N-SH	0.34	LoVo	0.56	SHP-77	0.46
D341 Med	0.91	LS123	0.23	A549	0.45
Daoy	0.17	SNU-C1	0.03	NCI-H23	0.2
DBTRG-05MG	0.63	SK-CO-1	0.45	NCI-H226	1.93
U-118 MG	0.07	SW 403	0.04	NCI-H358	0.16
U-87 MG	1.51	SW 48	0.44	NCI-H460	0.33
CCF-STTG1	0.27	SW 480	0.16	NCI-H522	0.77
SW 1088	0.36	SW 620	1.1	NCI-H661	0.27
HCC1937	0.43	SW 837	0.34	NCI-H810	0.5
ZR-75-1	2.55	SW 948	0.07	NCI-H1155	0.24
AU565	2.59	HEK293	0.32	NCI-H1299	0.29
MCF-7	0.56	SAEC	0.96	NCI-H1395	0.27
MDA-MB-231	0.71	NCI-H187	3.12	NCI-H1417	1.58
Caco-2	0.22	NCI-H378	0.77	NCI-H1435	0.13
COCM1	0.23	NCI-H526	0.89	NCI-H1581	0.54
NCI-H1651	0.14	ES-2	0.26	BxPC-3	0.25
NCI-H1703	0.33	Caov-3	0.15	Capan-1	0.15
NCI-H1793	0	MDAH2774	0.31	Capan-2	0.08
NCI-H1963	1.25	NIH:OVCA3	1.04	HPrEC	0.55
NCI-H2073	0.08	OV-90	0.4	DU 145	0.84
NCI-H2085	0.22	SK-OV-3	0.26	PC3	0.23
NCI-H2106	0.82	TOV-112D	0.88	WERI-Rb-1	0.89
NCI-H2228	0.2	TOV-21G	0.53	Y79	0.81
NCI-H2342	0.48	PANC-1	0.34	Cates-1B	0.31
NCI-H2347	0.21	MIA-PaCa-2	0.03		
VMRC-LCD	0.74	AsPC-1	0.06		

組換え型完全長タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築（その１）

TACT427-Aタンパク質およびTACT427-Bタンパク質のC末端に3xFLAGタグを融合したタンパク質を発現する動物細胞用発現ベクターを構築した。

- 実施例４で得たTACT427-A/pCR-BluntII-TOPO、TACT427-B/pCR-BluntII-TOPO、  
5 およびp3xFLAG-CMV-14（Sigma社）を制限酵素EcoRIおよびXbaIにて処理し、アガ  
ロースゲル電気泳動で分離後、TACT427-A、TACT427-Bおよびp3xFLAG-CMV-14に相  
当するDNA断片を回収し、Gel Extraction Kit (QIAGEN社)を用いて精製した。そ  
れぞれのDNA断片をDNA Ligation Kit ver.2 (Takara Bio社)を用いてライゲー  
ション反応を行った後、大腸菌TOP10に導入し、アンピシリンを含むLB寒天培地  
10 中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、TACT427-Aタンパク質  
（配列番号：１５）、およびTACT427-Bタンパク質（配列番号：２０）をコード  
するcDNA配列を有する動物細胞用発現ベクターp3xFLAG-TACT427-A、および  
p3xFLAG-TACT427-Bを得た。

## 15 【実施例１０】

組換え型完全長タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築（その２）

TACT427-Aタンパク質（配列番号：１５）を発現する動物細胞用発現ベクター  
を構築した。

- 実施例９で得られたp3xFLAG-TACT427-Aを鋳型とし、プライマー９（配列番  
20 号：３９）およびプライマー１０（配列番号：４０）を用いてPCR反応を行った。  
該反応における反応液の組成はp3xFLAG-TACT427-A 200 ngを鋳型として使用し、  
Pfu Turbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE社)を2.5 U、プライマー９  
（配列番号：３９）およびプライマー１０（配列番号：４０）を各1μM、dNTPs  
を200μM、およびGC Buffer I (Takara Bio社)を25μl加え、50μlの液量とし  
25 た。PCR反応は、95℃・1分の後、95℃・15秒、60℃・15秒、72℃・3分のサイク  
ルを25回繰り返し行った。次にPCR Purification Kit (QIAGEN社)にて該PCR反  
応産物を精製した後、制限酵素XbaIおよびEcoRIにて処理した。pcDNA3.1(+)  
（Invitrogen社）も制限酵素XbaIおよびEcoRIにて処理した。これらをアガロー  
スゲル電気泳動で分離後、TACT427-Aタンパク質をコードする塩基配列を含むDNA

断片とpcDNA3.1(+)に相当するDNA断片をそれぞれ回収し、Gel Extraction Kit(QIAGEN社)を用いて精製した。それぞれのDNA断片をDNA Ligation Kit ver.2 (Takara Bio社)を用いてライゲーション反応を行った後、大腸菌TOP10に導入し、アンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、TACT427-Aタンパク質をコードするcDNA配列を有する動物細胞用発現ベクターpcDNA3.1(+)-TACT427-Aを得た。

### 【実施例 11】

#### ペプチド抗体の作製と精製

10 TACT427タンパク質のアミノ酸配列に基づき、15アミノ酸からなる以下の3種のペプチド（ペプチド1～3）をFmoc固相合成法を用いて合成した。

15 ペプチド1のアミノ酸配列〔Gly-Ser-Gly-Glu-Glu-Asn-Asp-Pro-Gly-Glu-Gln-Ala-Leu-Pro-Cys（配列番号：41）〕は、TACT427-Aタンパク質（配列番号：15）の220番目から233番目までのアミノ酸配列のC末端に、Cysを付加した配列である。

ペプチド2〔Gly-Pro-Ala-Glu-Gly-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Ala-Glu-Ala-Ser-Cys（配列番号：42）〕のアミノ酸配列は、TACT427-Aタンパク質（配列番号：15）の517番目から530番目までのアミノ酸配列のC末端に、Cysを付加した配列である。

20 ペプチド3のアミノ酸配列〔Gly-Ser-Val-Gly-Gly-Asn-Thr-Gly-Val-Arg-Gly-Lys-Phe-Glu-Cys（配列番号：43）〕は、TACT427-Aタンパク質（配列番号：15）の800番目から813番目までのアミノ酸配列のC末端に、Cysを付加した配列である。

25 上記ペプチド1、ペプチド2およびペプチド3のそれぞれのペプチドに、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）をキャリアータンパク質として結合させ抗原とし、以下のように、ウサギポリクローナル抗体を作製した。

免疫動物は雄性ウサギKBL:JW（11週齢、オリエンタル酵母）一羽を用い、初回感作は完全フロインドアジュバンド（Difco社）懸濁液、2回目以降は不完全フロインドアジュバンド（Difco社）懸濁液を用いた。感作は背部皮下注射

により行い、1回の感作には各抗原0.5mgを用い、初回感作後14日毎に3回繰り返した。初回感作後52日目に麻酔下頸動脈採血を行い、血清約50 mlを得た。このようにして得られた血清を硫酸アンモニウム塩析法により濃縮し、得られた粗IgG画分全量をプロテインAアフィニティーカラム (Amersham-Bioscience社) に  
5 より精製し、ペプチド1、ペプチド2またはペプチド3を免疫したウサギから、それぞれ約223 mg、約495 mgおよび約390 mgの精製IgGを得た。さらにペプチド1に対する精製IgG 111mg、ペプチド2に対する精製IgG 248mgおよびペプチド3に対する精製IgG 195mgを材料として、各々の免疫源ペプチドを固定化したカラムに結合するIgG画分を取得した。固定化には各ペプチドのC末端のCysを利用し、  
10 ホウ酸緩衝液を用いてセファロースカラム (Amersham-Bioscience社) にカップリングした。カラムからの溶出には8M尿素/リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を用いた。溶出液をPBSに対して透析して尿素を除いた後、限外濃縮、フィルター過滅菌することにより、ペプチド1、ペプチド2およびペプチド3に対するアフィニティー精製抗体AS-2480、AS-2481およびAS-2482を、約3.7 mg、約0.69 mg  
15 および約17 mgずつ取得した。

### 【実施例12】

#### ウサギペプチド抗体を用いたウェスタンブロッティング

TACT427-Aタンパク質 (配列番号: 15) の検出は、実施例11で作製したペ  
20 プチド抗体を含むウサギ血清を用いて行った。ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞  
 $1.0 \times 10^6$ 個を10%牛胎仔血清 (JRH社) を含むダルベッコ改変型イーグル最少培地  
(Invitrogen社) 9 mlに懸濁し、直径10 cmのペトリディッシュに播種した。5%  
炭酸ガス気流下、37℃で一晩培養した後、予めFuGene6トランスフェクション試  
薬18  $\mu$ l (Roche Diagnostics社) およびOPTI-MEM I (Invitrogen社) と混合し室  
25 温で15分間放置しておいたp3xFLAG-TACT427-A 6  $\mu$ gを添加し同条件で培養を継続  
した。2日後に細胞をPBSで洗浄後、氷冷したRIPA緩衝液 [50mM トリス・塩酸緩  
衝液、pH 7.5、150 mM 塩化ナトリウム、1% Triton X-100、0.1% SDS、1% デオ  
キシコール酸、Complete™ タブレット (Roche Diagnostics社)、Phosphatase  
Inhibitor Cocktail-2 (Sigma社) ] 800  $\mu$ lを添加し4℃で15分間放置した。この

RIPA緩衝液を回収し、15,000 rpmで20分間遠心分離した上澄液を無細胞抽出液とし、20  $\mu$ lを7.5%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。泳動分離したタンパク質は、常法に従いクリアプロットP膜（ATTO社）に転写した後、ブロッキング溶液（トリス緩衝化生理食塩水、0.1% Tween-20、5% スキムミルク）中に1時間室温放置した。次に実施例11で作製したペプチド抗体AS-2480、AS-2481またはAS-2482を含む3種類のウサギ血清を、ブロッキング溶液中で各々100倍に希釈して加え、4℃にて一晩インキュベートし、続いてHRP標識抗ウサギIgG抗体（Amersham-Bioscience社）をブロッキング溶液で10万倍に希釈した2次抗体溶液中で1時間室温放置した。検出はECL plus（Amersham-Bioscience社）の添付プロトコールに従い行った。

ペプチド抗体AS-2480、AS-2481またはAS-2482を含む3種類のウサギ血清のいずれを用いても、分子量150kD近傍の位置にTACT427-Aタンパク質に由来する特異的なバンドが認められた。

### 【実施例13】

ペプチド抗体を用いた免疫沈降

実施例11で作製したペプチド抗体を用いて、TACT427-Aタンパク質に対する免疫沈降を非変性状態にて行った。

実施例9で得たp3xFLAG-TACT427-Aを用いて実施例12と同様の操作で調製した無細胞抽出液1 mlに、Protein G-Sepharose 4FF（Amersham-Bioscience社）懸濁液（等容量のRIPA緩衝液で懸濁したもの）50  $\mu$ lとウサギ血清3  $\mu$ lとを加え、4℃にて一晩攪拌を行った。ウサギ血清としては、実施例11で作製したペプチド抗体AS-2480、AS-2481またはAS-2482を含む3種類のウサギ血清のいずれかを用いた。Protein G-Sepharose 4FF共沈殿画分をRIPA緩衝液にて洗浄後、1% 2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE用サンプルバッファー（Bio Rad社）50  $\mu$ lに懸濁し95℃で5分間加熱した後、20  $\mu$ lを7.5%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。検出は実施例12に記載の方法に準じた。但し一次抗体としてマウス抗FLAG M2抗体（Sigma社）をブロッキング溶液で10  $\mu$ g/mlとなるよう希釈したもの、二次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体（Amersham-Bioscience社）をプロ

ッキング溶液で5万倍に希釈したものを用いた。ペプチド抗体AS-2480、AS-2481またはAS-2482を含む3種類のウサギ血清のいずれを用いて免疫沈降を行った場合にも、分子量150kD近傍にTACT427-Aタンパク質に由来する特異的なバンドが認められた。

- 5      これより、ペプチド抗体AS-2480、AS-2481およびAS-2482は、未変性のTACT427-Aタンパク質と結合することが明らかとなった。

#### 【実施例 1 4】

癌細胞株におけるTACT427タンパク質の発現検討

- 10      直径10cmのペトリディッシュに播種した肺癌細胞株A549、NCI-H226ならびにNCI-H522および乳癌細胞株ZR-75-1をPBSで洗浄後、実施例 1 2 に記載の方法に従い無細胞抽出液を作製した。A549、NCI-H226、NCI-H522およびZR-75-1の無細胞抽出液各々1mlに、Protein G-Sepharose 4FF (Amersham-Bioscience社) 懸濁液(等容量のRIPA緩衝液で懸濁したもの) 50  $\mu$ lと、実施例 1 1 で作製したペプチド抗体AS-2482を3  $\mu$ g加え、4℃にて一晚攪拌を行った。Protein G-Sepharose 4FF共沈殿画分をRIPA緩衝液にて洗浄後、1% 2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE用サンプルバッファー (Bio Rad社) 50  $\mu$ lに懸濁し95℃で5分間加熱した後、20  $\mu$ lを7.5%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。ペプチド抗体AS-2482を用いて実施例 1 2 に記載の方法に準じて検出を行った。

- 20      A549、NCI-H226、NCI-H522およびZR-75-1のいずれにおいても、分子量150kD近傍に、TACT427タンパク質に由来する特異的なバンドが認められた。

これより、上記タンパク質が上記5種類の癌細胞株で発現していることが明らかとなった。

#### 25      【実施例 1 5】

TACT427-Aタンパク質の局在性検討 (細胞染色)

ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞 $1 \times 10^5$ 個を10%牛胎仔血清 (JRH社) を含むダルベッコ改変型イーグル最少培地 (Invitrogen社) に懸濁し、2ウェル ポリ-D-リジンコートカルチャースライド (BDファルコン社) に播種した。同様に $5 \times 10^4$ 個の

ヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H460を10%牛胎仔血清（JRH社）を含むRPMI1640培地（Invitrogen社）に懸濁し2ウェル ポリ-D-リジンコートカルチャースライド（BDファルコン社）に播種した。5%炭酸ガス気流下、37℃で一晩培養した後、  
5 OPTI-MEM I（Invitrogen社）と混合し室温で15分間放置しておいたp3xFLAG-TACT427-A 1.33  $\mu$ gを添加し同条件で培養を継続した。2日後に細胞をPBSで洗浄後、10%中性ホルマリン緩衝液を加え室温で30分間固定した。その後PBSで0.1%に希釈したTriton X-100を加え室温で5分放置した後、再びPBSで洗浄し、更に  
10 1% BSAを含むPBSを加え4℃で24時間放置し、抗体の非特異的結合サイトをブロックした。次に1% BSAを含むPBSで10  $\mu$ g/mlとなるよう希釈したマウス抗FLAG M2抗体（Sigma社）を加え、室温で45分間反応させてからPBSで洗浄し、続いて1% BSAを含むPBSで10  $\mu$ g/mlとなるよう希釈したAlexa488標識抗マウスIgG抗体（Molecular Probes社）を加えた。再び室温で45分間反応させてからPBSで洗浄した後、蛍光顕微鏡により観察した。

15 その結果、TACT427-Aタンパク質は、HEK293、NCI-H460のいずれにおいても細胞質膜上に発現していることが明らかとなった。

また同様の方法でHEK293細胞に、pcDNA3.1(+)-TACT427-Aプラスミドを導入し、10  $\mu$ g/mlのAS-2480、AS-2481およびAS-2482を一次抗体として、10  $\mu$ g/mlのAlexa488標識抗ウサギIgG抗体（Molecular Probes社）を二次抗体として用いて、  
20 TACT427-Aタンパク質の局在性を調べたところ、同じく細胞質膜上に発現していることが明らかとなった。

#### 【実施例 16】

##### TACT427-Aタンパク質の局在性検討（ビオチン標識）

25 実施例 12と同様の方法で、HEK293細胞にp3xFLAG-TACT427-Aプラスミドを導入し、48時間後に細胞表層上に露出したタンパク質をCellular Labeling and Immunoprecipitation Kit（Roche Diagnostics社）を用いてビオチン標識を行った。さらに実施例 12の方法に従い調製した無細胞抽出液1 mlとマウス抗FLAG M2抗体（Sigma社）3  $\mu$ gとを用いて実施例 13の方法に従って免疫沈降しSDS-

PAGEを行った。HRP標識したストレプトアビジン（Amersham-Bioscience社）を用いて検出したところ、分子量150kD近傍にTACT427-Aタンパク質に由来するバンドが認められ、TACT427-Aタンパク質が細胞質膜上に発現することが明らかとなった。

5

#### 【実施例 17】

TACT427タンパク質の局在性検討（ビオチン標識）

直径10cmのペトリディッシュに播種したヒト非小細胞肺癌細胞株A549、NCI-H226およびNCI-H522の細胞表層上に露出しているタンパク質をCellular

10 Labeling and Immunoprecipitation Kit（Roche Diagnostics社）を用いてビオチン標識を行った。さらに実施例12の方法に従い調製した無細胞抽出液1 mlとウサギペプチド抗体AS-2482 3  $\mu$ gとを用いて実施例13の方法に従って免疫沈降しSDS-PAGEを行った。HRP標識したストレプトアビジン（Amersham-Bioscience社）を用いて検出したところ、A549、NCI-H226およびNCI-H522のいずれにおいても、分子量150kD近傍にTACT427-Aタンパク質、TACT427-A2タンパク質、TACT427-Bタンパク質、TACT427-B2タンパク質、TACT427-Cタンパク質およびTACT427-C2タンパク質に由来するバンドが認められた。

15

これより、TACT427タンパク質が細胞質膜上に発現していることが明らかとなった。

20

#### 【実施例 18】

TACT427タンパク質の局在性検討（FACS解析）

直径10cmのペトリディッシュに播種しサブコンフルエントにまで培養したヒト非小細胞肺癌細胞株A549をPBSで洗浄後、3% BSAおよび5mM EDTAを含むPBSを加え室温で15分間放置しA549細胞を分散した。次に緩衝液A〔2%牛胎仔血清（JRH社）および0.1%アジ化ナトリウムを含むHBSS（Hanks' Balanced Salt Solutions、Invitrogen社）〕で $1 \times 10^6$ 個/mlの濃度になるようにA549細胞を懸濁し、終濃度5  $\mu$ g/mlとなるようにAS-2482または非免疫ウサギIgG（Jackson社）を加え、氷上に5時間放置した。続いて緩衝液Aで細胞を洗浄した後、10  $\mu$ g/mlの

25



Alexa488標識抗ウサギIgG抗体 (Molecular Probes社) を含む緩衝液Aで懸濁し、氷上にて1.5時間放置した。緩衝液Aで再び洗浄後、FACScan (BDパイオサイエンス社) にて解析した。その結果、ウサギペプチド抗体AS-2482特異的にA549細胞が染色され、TACT427-Aタンパク質、TACT427-A2タンパク質、TACT427-Bタンパク質、TACT427-B2タンパク質、TACT427-Cタンパク質およびTACT427-C2タンパク質が細胞質膜上に発現していることが明らかとなった。

### 【実施例 19】

アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によるヒト非小細胞肺癌細胞株A549およびNCI-H226のアポトーシス誘導

実施例2に記載のNCI-H460以外のヒト非小細胞肺癌細胞株においてもアンチセンスオリゴヌクレオチド導入によりアポトーシスが誘発されるか否かを検討した。

ヒト非小細胞肺癌細胞株A549およびNCI-H226 (いずれもATCCより購入) を、それぞれKaighn's改変F-12 Nutrient Mixture (Invitrogen社) および25mM HEPES含有RPMI-1640培地 (Invitrogen社) に牛胎仔血清 (JRH社) を10%加えた培地で懸濁し、1ウェル当たり $1 \times 10^4$ 個の細胞密度で96穴平底組織培養プレート (BDファルコン社) に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、オリゴヌクレオチドを導入した。

以下に述べる実施例19、20および21で用いたセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 44) は、実施例2に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 13) に相補的な配列を有するように設計し、phosphorothioate化した後、HPLC精製して用いた (以下、センスオリゴヌクレオチドと略する)。

具体的には、A549細胞の場合には、実施例2で得られたアンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 13)、コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 14)、およびセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 44)、それぞれ0.05  $\mu$ gをリポフェクトアミン2000 (Invitrogen社) 0.8  $\mu$ lと共に、OPTI-MEM I

(Invitrogen社) 50  $\mu$ lと混合し、室温で20分間放置した。予めOPTI-MEM I

(Invitrogen社) 50  $\mu$ lに培地交換しておいたA549細胞に該混合液中を全量添加し、更に3時間培養を継続した後、10%牛胎仔血清 (JRH社) を含むKaighn's改変

F-12 Nutrient Mixture (Invitrogen社) 100  $\mu$ lに培地交換した。

NCI-H226細胞の場合では、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：13）、コントロールオリゴヌクレオチド（配列番号：14）、およびセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：44）のそれぞれ0.13  $\mu$ gを、オリゴフェクトアミン（Invitrogen社）0.8  $\mu$ lと共に、OPTI-MEM I（Invitrogen社）50  $\mu$ lと混合し、室温で20分間放置した。予めOPTI-MEM I（Invitrogen社）50  $\mu$ lに培地交換しておいたNCI-H226細胞に該混合液を全量添加し、更に3時間培養を継続した後、30%牛胎仔血清（JRH社）を含む25mM HEPES含有RPMI-1640培地（Invitrogen社）50  $\mu$ lを添加した。

- 10 オリゴヌクレオチドを導入して更に2日間培養した後、Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche Diagnostics社)の添付プロトコールに従い、上記オリゴヌクレオチドのアポトーシス誘導活性を測定した。

その結果、両細胞株においてアンチセンスオリゴヌクレオチドは陰性対象として用いたコントロールオリゴヌクレオチドおよびセンスオリゴヌクレオチドに比べ、それぞれ1.65倍および3.03倍のアポトーシス誘導活性を示し、統計学的に有意な差（ $P \leq 0.01$ ）を示した。

#### 【実施例20】

- 20 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によるヒト非小細胞肺癌細胞株A549およびNCI-H226におけるFLJ20539遺伝子（配列番号：2）、hCP50177遺伝子（配列番号：5）、hCP1762319遺伝子（配列番号：8）ならびにFLJ13515遺伝子（配列番号：11）、およびTACT427遺伝子のmRNA発現量低下

実施例3に記載のNCI-H460以外のヒト非小細胞肺癌細胞株においてもアンチセンスオリゴヌクレオチド投与により、上記遺伝子のmRNA発現量が低下するか否か調べた。

ヒト非小細胞肺癌細胞株A549およびNCI-H226をそれぞれ実施例19と同じ培地に懸濁し、1ウェル当たりA549細胞株では $7.5 \times 10^4$ 個、NCI-H226細胞株では $5 \times 10^4$ 個の細胞密度で24穴平底組織培養プレート（BDファルコン社）に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、オリゴヌクレオチドをトランスフ

エクシオンした。

具体的に、A549細胞株では、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：13）、コントロールオリゴヌクレオチド（配列番号：14）、およびセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：44）のそれぞれ0.84 $\mu$ gをリポフェクトアミン 2000（Invitrogen社）3.2 $\mu$ lと共に、Opti-MEM I（Invitrogen社）200 $\mu$ lと混合し、室温で20分間放置した。予めOPTI-MEM I（Invitrogen社）200 $\mu$ lに培地交換しておいたA549細胞に該混合液を全量添加し、更に3時間培養を継続した後、10%牛胎仔血清（JRH社）を含むKaighn's改変F-12 Nutrient Mixture（Invitrogen社）500 $\mu$ lに培地交換した。

NCI-H226細胞の場合では、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：13）、コントロールオリゴヌクレオチド（配列番号：14）、およびセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：44）のそれぞれ0.13 $\mu$ gを、オリゴフェクトアミン（Invitrogen社）2 $\mu$ lと共にOpti-MEM I（Invitrogen社）125 $\mu$ lと混合し、室温で20分間放置した。予めOPTI-MEM I（Invitrogen社）125 $\mu$ lに培地交換しておいたNCI-H226細胞に該混合液を全量添加し、更に4時間培養を継続した後、30%牛胎仔血清（JRH社）を含む25mM HEPES含有RPMI-1640培地（Invitrogen社）125 $\mu$ lを加えた。

オリゴヌクレオチドをトランスフェクションし、更に16時間培養を継続した後、RNeasy Mini Total RNA Kit（QIAGEN社）を用いてA549細胞およびNCI-H226細胞からトータルRNAを抽出した。TaqMan<sup>TM</sup> Reverse Transcription Reagents（Applied Biosystems社）の添付プロトコールに従い、ランダムプライマーを用いた逆転写反応によってトータルRNAからcDNAを調製した。トータルRNA 5 ngから調製したcDNAを鋳型とし、実施例6と同様の方法によりFLJ20539遺伝子（配列番号：2）、hCP50177遺伝子（配列番号：5）、hCP1762319遺伝子（配列番号：8）ならびにFLJ13515遺伝子（配列番号：11）、およびTACT427遺伝子の発現量を測定した。同量の鋳型cDNA中に含まれる $\beta$ -アクチン遺伝子発現量をTaqMan<sup>TM</sup>  $\beta$ -actin Control Reagents（Applied Biosystems社）を用いて測定し内部標準とした。

$\beta$ -アクチン遺伝子発現量に対する上記遺伝子の相対的発現量比率（%）は、

陰性対照として用いたコントロールオリゴヌクレオチド（配列番号：14）またはセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：44）を導入した場合に比べて、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：13）を導入した場合に顕著に低下しており、統計学的に有意（ $P \leq 0.01$ ）な発現量低下が認められた（表7）。

- 5 この結果より、ヒト非小細胞肺癌細胞株A549およびNCI-H226においても、FLJ20539遺伝子（配列番号：2）、hCP50177遺伝子（配列番号：5）、hCP1762319遺伝子（配列番号：8）ならびにFLJ13515遺伝子（配列番号：11）、およびTACT427遺伝子のmRNA発現量低下により、アポトーシスが誘発されたことが示された。

10

〔表7〕

	相対的遺伝子発現量 (対ベータアクチン発現量比率、%)	
	A 5 4 9	N C I - H 2 2 6
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号：14)	0.44	1.01
センスオリゴヌクレオチド (配列番号：44)	0.44	1.08
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号：13)	0.09	0.22

## 【実施例21】

- 15 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によるA549およびNCI-H226におけるTACT427タンパク質の発現量低下

ヒト非小細胞肺癌細胞株A549およびNCI-H226をそれぞれ実施例19と同じ培地に懸濁し、A549細胞株では $2.25 \times 10^6$ 個、NCI-H226細胞株では $1.45 \times 10^6$ 個の細胞を直径10cmのペトリディッシュ（BDファルコン社）に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、オリゴヌクレオチドをトランスフェクションした。

- 20 具体的には、A549細胞株では、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：13）、コントロールオリゴヌクレオチド（配列番号：14）およびセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：44）のそれぞれ $5.8 \mu\text{g}$ を、リポフェクトアミン2000（Invitrogen社） $96 \mu\text{l}$ と共に、Opti-MEM I（Invitrogen社）6 mlと混合し、

室温で20分間放置した。予めOPTI-MEM I (Invitrogen社) 6 mlに培地交換しておいたA549細胞に該混合液を全量添加し、更に3時間培養を継続した後、10%牛胎仔血清 (JRH社) を含むKaighn's改変F-12 Nutrient Mixture (Invitrogen社) 15 mlに培地交換した。

- 5 NCI-H226細胞株では、アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3)、コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4) およびセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 4 4) のそれぞれ9.7  $\mu$ gを、オリゴフェクトアミン (Invitrogen社) 60  $\mu$ lと共にOpti-MEM I (Invitrogen社) 3.75 mlと混合し、室温で20分間放置した。予めOPTI-MEM I (Invitrogen社) 3.75 mlに培地交換しておいたNCI-H226細胞に該混合液を全量添加し、更に4時間培養を継続した後、30%牛胎仔血清 (JRH社) を含む25mM HEPES含有RPMI-1640培地 (Invitrogen社) 3.75 mlを加えた。

- 15 トランスフェクション後、更に24時間、48時間、72時間培養を継続した後に、実施例 1 2 の方法に従い無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液のタンパク質濃度をBCA Protein Assay Kit (Pierce社) にて測定し、各無細胞抽出液中のタンパク質濃度をそろえた。A549細胞株の無細胞抽出液100  $\mu$ g、およびNCI-H226細胞株の無細胞抽出液140  $\mu$ gを、実施例 1 2 の方法に準じてSDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングをそれぞれ行った。一次抗体として実施例 1 1 で作製したAS-2482を3  $\mu$ g/mlの濃度で、二次抗体としてHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Amersham-Bioscience社) を用いた。検出はSuper Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce社) を用いて添付のマニュアルに従った。

- 25 その結果、両細胞株ともアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した場合にのみ、TACT427タンパク質がほぼ消失しているのが確認され、かつ、該タンパク質の消失は24時間で認められた。また、同時にサイトケラチン8タンパク質の発現量を抗ヒトサイトケラチン8抗体 (Oncogene社) を用いたウェスタンブロッティング法で調べたが、いずれのオリゴヌクレオチド処理でも発現量減少は認められなかった。これより、TACT427タンパク質発現量の特異的低下により、ヒト肺癌細胞株のアポトーシスが誘発されたことが示された。

## 【実施例 2 2】

## 組換え型完全長タンパク質の安定発現細胞株の樹立

- TACT427-Aタンパク質（配列番号：15）のC末端に3xFLAGタグを融合したタンパク質を構成的に発現する細胞株の樹立をマウス胎仔由来線維芽細胞株 Balb3T3-A31（以後、A31細胞と略記する）を用いて行った。A31細胞 $1.25 \times 10^5$ 個を10%牛胎仔血清（JRH社）および $50 \mu\text{g/ml}$  ゲンタマイシン（Invitrogen社）を含むダルベッコ改変型イーグル最少培地（Invitrogen社）2.5 mlに懸濁し、6穴プレートの1ウェルに播種した後、5%炭酸ガス気流下、 $37^\circ\text{C}$ で一晩培養した。
- さらに同じ培地2.5 mlに培地交換し4時間培養を継続した後、予めFuGENE6トランスフェクション試薬 $3.8 \mu\text{l}$ （Roche Diagnostics社）およびOPTI-MEM I（Invitrogen社） $93.3 \mu\text{l}$ と混合し室温で15分間放置しておいたプラスミド p3xFLAG-TACT427-A  $1.25 \mu\text{g}$ を添加し培養を継続した。翌日にトリプシン・EDTA（Invitrogen社）を用いて細胞を回収し、 $0.5 \text{ mg/ml}$ のG418（Promega社）を含む上記培地（G418選択培地）10 mlに懸濁し、直径10 cmのペトリディッシュに播種した。G418選択培地で培養を継続し2回継代培養した後、1ウェルあたり細胞100個（培地容量0.1 ml）の割合から始まる2倍希釈系列を12系列作成し96穴プレートにそれぞれ播種し、3日ごとにG418選択培地を交換しながら培養を継続した。ウェルあたり0.8個～3.2個の細胞が増殖しコロニーを形成したウェルから11日後に細胞を回収し、24穴プレートの2ウェルに等しく播種した。G418選択培地でコンフルエントになるまで培養を継続した後、1ウェル分の細胞をスクレイパーで回収し、1% 1% 2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE用サンプルバッファー（Bio Rad社） $40 \mu\text{l}$ に懸濁した。 $95^\circ\text{C}$ で5分間加熱処理した後、 $12 \mu\text{l}$ を10%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。実施例 1 3 で記載した方法に準じ、マウス抗FLAG M2抗体（Sigma社、1000倍希釈）を用いてウエスタンブロッティングを行い、TACT427-Aタンパク質（配列番号：15）のC末端に3xFLAGタグが付加したタンパク質を構成的に発現する細胞株TACT-1を得た。

## 【実施例 2 3】

## TACT-1のアポトーシス耐性能の評価

- 実施例 2 2 で得られたTACT-1およびその親株A31細胞を10%牛胎仔血清 (JRH 社) および50  $\mu$ g/ml ゲンタマイシン (Invitrogen社) を含むダルベッコ改変型イーグル最少培地 (Invitrogen社) 0.1 mlに懸濁し1ウェルあたり $6 \times 10^3$ 個になるよう  
5 うそれぞれ組織培養用96穴プレートに播種した。5%炭酸ガス気流下、37℃で一晩培養した後、トポイソメラーゼI阻害剤カンプトテシン (Wako Pure Chemical 社) あるいはタンパク質合成阻害剤アニソマイシン (Wako Pure Chemical社) を種々の濃度になるよう添加した上記培地に交換し培養を継続した。24時間後に  
10 Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche Diagnostics社) を用いてアポトーシスを検出した。終濃度1  $\mu$ g/mlのカンプトテシン添加によりTACT-1に誘発されたアポトーシスは、同じ条件でA31に認められたアポトーシスの56%にとどまった。また終濃度1  $\mu$ g/mlのアニソマイシン添加によりTACT-1に誘発されたアポトーシスは、同じ条件でA31に認められたアポトーシスの69%にとどまった。以上の結果は、カンプトテシンやアニソマイシンによって誘発されるアポトーシスに対し、  
15 TACT-1細胞が耐性になっていることを示しており、TACT427-A強制発現によりアポトーシス耐性能を獲得することが明らかとなった。

## 【実施例 2 4】

## TACT-1におけるERK1/2リン酸化増強

- 20 実施例 2 3 で記載したTACT-1細胞株のアポトーシス耐性現象のメカニズムを調べる一環として、抗アポトーシス作用に関与するMAPキナーゼ、即ちERK1/2タンパク質のリン酸化をA31細胞株と比較した。A31細胞には10%牛胎仔血清 (JRH 社) および50  $\mu$ g/ml ゲンタマイシン (Invitrogen社) を含むダルベッコ改変型イーグル最少培地 (Invitrogen社) を用い、TACT-1細胞には同培地に更に0.6  
25 mg/ml G418 (Promega社) を添加したものをを用いて、直径10 cmのペトリディッシュ (BD フェルコン社) で5%炭酸ガス気流中、37℃で培養した。細胞密度が約80%コンフルエントになった時点で、1  $\mu$ g/ml アニソマイシン (Wako Pure Chemical 社) を含む上記培地に交換し、37℃で1時間、4時間および8時間培養を続けた。アニソマイシン処理前の細胞も含めて、これらそれぞれの細胞を氷冷したPBS (Ca、

Mg不含) 10 mlで2回洗浄し、0.5 mlの細胞溶解用緩衝液 [1% Triton X-100、1%  
デオキシコール酸、0.05% SDS、5.25mM EGTA、EDTA不含Complete™ タブレッ  
ト (Roche Diagnostics社)、Phosphatase inhibitor cocktail-2 (Sigma社)、  
150mM 塩化ナトリウムを含む50mM トリス・塩酸緩衝液、pH7.5] を加えて4℃で  
5 20分間放置した。スクレイパーを用いて細胞破碎液を回収し、4℃、15000回転で  
20分間遠心分離して沈殿物を除去した。この細胞破碎液80  $\mu$ lに10% 2-メルカプ  
トエタノールを含む5倍濃縮SDS-PAGE用サンプルバッファー (Bio Rad社) を20  $\mu$   
l加え、95℃で5分間加熱した。なお、5  $\mu$ l細胞破碎液を蒸留水で10倍希釈し、  
Micro BCA protein assay reagent (Pierce社) の処方に準じてタンパク質濃度を  
10 測定し、2% 2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE用サンプルバッファー  
(Bio Rad社) で適宜希釈してタンパク質濃度を揃えた。総タンパク質24  $\mu$ gを  
7.5% ポリアクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した後、PVDF膜に転写した。転  
写した膜は5% スキムミルクを含むTTBS (0.1% Tween 20を含むTBS) で室温、1  
時間ブロッキングした後、10分間のTTBS洗浄を2回行った。その後、抗ERK1/2抗  
15 体 (Cell signaling社) または抗リン酸化ERK1/2抗体 (Cell signaling社) を  
5% BSA (Sigma社) を含むTTBSでそれぞれ5000倍または1000倍に希釈した一次抗  
体液を用いて4℃で一晩反応させた後、10分間のTTBS洗浄を4回行った。次に、  
5% スキムミルクを含むTTBSで10000倍に希釈したHRP標識抗ウサギIgG抗体  
(Amersham Bioscience社) を添加し室温で1時間保温した後、10分間のTTBS洗浄を  
20 4回行った。ECL plus試薬 (Amersham Bioscience社) を用いてERK1/2タンパク質  
およびリン酸化ERK1/2タンパク質に相当するバンドを検出した結果、TACT-1細胞  
株ではA31細胞株と比べ、アニソマイシン添加で誘導されるERK1/2タンパク質の  
リン酸化、即ち活性化が増強されていた。TACT-1細胞におけるERK1/2活性化亢進  
程度を求めるため、現像したフィルムをルミノイメージアナライザーLAS-  
25 1000plus (FUJIFILM社) で画像として読み取り、付属のイメージゲージソフトウ  
ェアを用いてリン酸化ERK1とリン酸化ERK2のバンド強度をそれぞれ数値化した。  
アニソマイシン処理時間 (2時間、4時間および8時間) 毎に、A31細胞のバンド強  
度を100%としてTACT-1細胞のリン酸化亢進率を算出したところ、TACT-1細胞に  
おけるERK1のリン酸化亢進率は164%、150%および158%、ERK2のリン酸化亢進



率は130%、137%および172%であった。

この結果から、TACT-1細胞株のアポトーシス耐性現象のメカニズムの一つがERK1/2の活性化増強作用であることが明らかとなった。

## 5 【実施例 2 5】

TACT-1におけるp38MAPKリン酸化促進

実施例 2 3 で記載したTACT-1細胞株のアポトーシス耐性現象のメカニズムを調べる一環として、p38MAPKのリン酸化をA31細胞株と比較した。

- 8×10<sup>5</sup>個のA31細胞またはTACT-1細胞を、10%牛胎仔血清（JRH社）および50 μg/ml ゲンタマイシン（Invitrogen社）を含むダルベッコ改変型イーグル最少培地（Invitrogen社）5 mlに懸濁し、直径6 cmのペトリディッシュ（BD フアルコン社）に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、終濃度1 μg/mlとなるようアニソマイシン（Wako Pure Chemical社）を添加し直ちに培養を継続した。アニソマイシン添加前あるいは添加後15分、30分および60分後の細胞を1 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウム（Wako Pure Chemical社）を含むPBS 5 mlで1回洗淨した後、実施例 1 2 に記載のRIPA緩衝液にPhosphatase Inhibitor Cocktail-1を加えた細胞溶解用緩衝液を0.2 ml添加し4℃で15分間放置した。スクレイパーで細胞破碎液を回収し4℃、15000回転で5分間遠心分離して沈殿物を除去した。この細胞破碎液80 μlに5% 2-メルカプトエタノールを含む5倍濃縮 SDS-PAGE用サンプルバッファー（Bio Rad社）を20 μl加え、95℃で5分間加熱した。なお、上記細胞溶解用緩衝液を蒸留水で20倍に希釈した溶液で細胞破碎液15 μlを20倍希釈し、Micro BCA protein assay reagent（Pierce社）の処方に準じてタンパク質濃度を測定し、タンパク質濃度がほぼ揃っていることを確認した。総タンパク質約14 μgを5%–20% ポリアクリルアミドグラジエントゲルでの SDS-PAGEに供した後、PVDF膜に転写した。転写した膜は5%スキムミルクを含む TTBS（0.1% Tween 20を含むTBS）で室温、1時間ブロッキングした後、5分間の TTBS洗淨を3回行った。その後、抗p38MAPK抗体（Cell signaling社）または抗リン酸化p38MAPK抗体（Cell signaling社）を5% BSA（Sigma社）を含むTTBSで 1000倍に希釈した一次抗体液を用いて4℃で一晩反応させた。続いて、5分間の

TTBS洗浄を3回行った後に、5%スキムミルクを含むTTBSで5000倍に希釈したHRP標識抗ウサギIgG抗体(Amersham Bioscience社)を添加し室温で1時間保温した。再び、5分間のTTBS洗浄を3回行い、過剰量の抗体を取り去った後に、ECL plus試薬(Amersham Bioscience社)を用いてp38MAPKタンパク質およびリン酸化p38MAPKタンパク質に相当するバンドを検出した。A31細胞ではp38MAPKタンパク質のリン酸化はアニソマイシン添加後30分ではようやく微かに認められたのに対し、TACT-1細胞ではアニソマイシン添加後15分で明らかに強く認められ、p38MAPKタンパク質のリン酸化、即ち活性化が速やかに誘導されることが判明した。

この結果から、TACT-1細胞株のアポトーシス耐性現象のメカニズムの一端をp38MAPKの活性化増強作用が担っていることが示唆された。

#### 産業上の利用可能性

本発明で用いられるタンパク質は、癌細胞に特異的に発現し、癌の診断マーカーであり、したがって、該タンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として安全に使用することができる。好ましくは、乳癌、肺癌などの予防・治療剤である。さらに、該タンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、癌細胞のアポトーシス促進剤として安全に使用することもできる。

また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドや抗体は、本発明で用いられるタンパク質の発現や活性を阻害することができ、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤、好ましくは、乳癌、肺癌などの予防・治療剤として、あるいは癌細胞のアポトーシス促進剤として安全に使用することができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：4、配列番号：7、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 5 2. 配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。
- 10 3. 請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
4. 請求項1記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：5、配列番号：8、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される塩基配列を含有する請求項5記載のポリヌクレオチド。
- 15 7. 配列番号：16、配列番号：18、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：26または配列番号：28で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。
- 20 8. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
9. 請求項8記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
10. 請求項9記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質またはその部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項1記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩の製造法。
- 25 11. 請求項1記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。
12. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
13. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。
14. 請求項1記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対

する抗体。

15. 請求項14記載の抗体を含有してなる医薬。

16. 請求項14記載の抗体を含有してなる診断薬。

5 17. 請求項4記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド。

18. 請求項17記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

19. 請求項14記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質の定量方法。

10 20. 請求項19記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断方法。

21. 請求項1記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

15 22. 請求項1記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項1記載のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

23. 請求項21記載のスクリーニング方法または請求項22記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩。

20 24. 請求項4記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

25. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

25 26. 請求項24記載のスクリーニング方法または請求項25記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩。

27. 請求項23または請求項26記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

28. 配列番号：1または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド。

5 29. 請求項28記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

30. 請求項28記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。

31. 配列番号：1または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

10 32. 請求項31記載の抗体を含有してなる医薬。

33. 請求項31記載の抗体を含有してなる診断薬。

34. 配列番号：1または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。

15 35. 癌の予防・治療剤である請求項11、請求項12、請求項15、請求項18、請求項27、請求項29または請求項32記載の医薬。

36. 癌の診断薬である請求項13、請求項16、請求項30、請求項33または請求項34記載の診断薬。

20 37. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。

25 38. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。

39. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番

号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25  
または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア  
ミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用い  
ることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法。

- 5 40. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番  
号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25  
または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア  
ミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有  
することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

- 10 41. 請求項39記載のスクリーニング方法または請求項40記載のスクリー  
ニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤。

42. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番  
号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25  
または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア  
ミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌク  
レオチドを用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法。

- 15 43. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番  
号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25  
または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア  
ミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌク  
レオチドを含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キッ  
ト。

- 20 44. 請求項42記載のスクリーニング方法または請求項43記載のスクリー  
ニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤。

- 25 45. アポトーシス促進剤である請求項11、請求項12、請求項15、請求  
項18、請求項27、請求項29または請求項32記載の医薬。

46. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番  
号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25  
または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア

ミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法。

47. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25

5 または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法。

48. 哺乳動物に対して、(i) 請求項14もしくは請求項31記載の抗体、

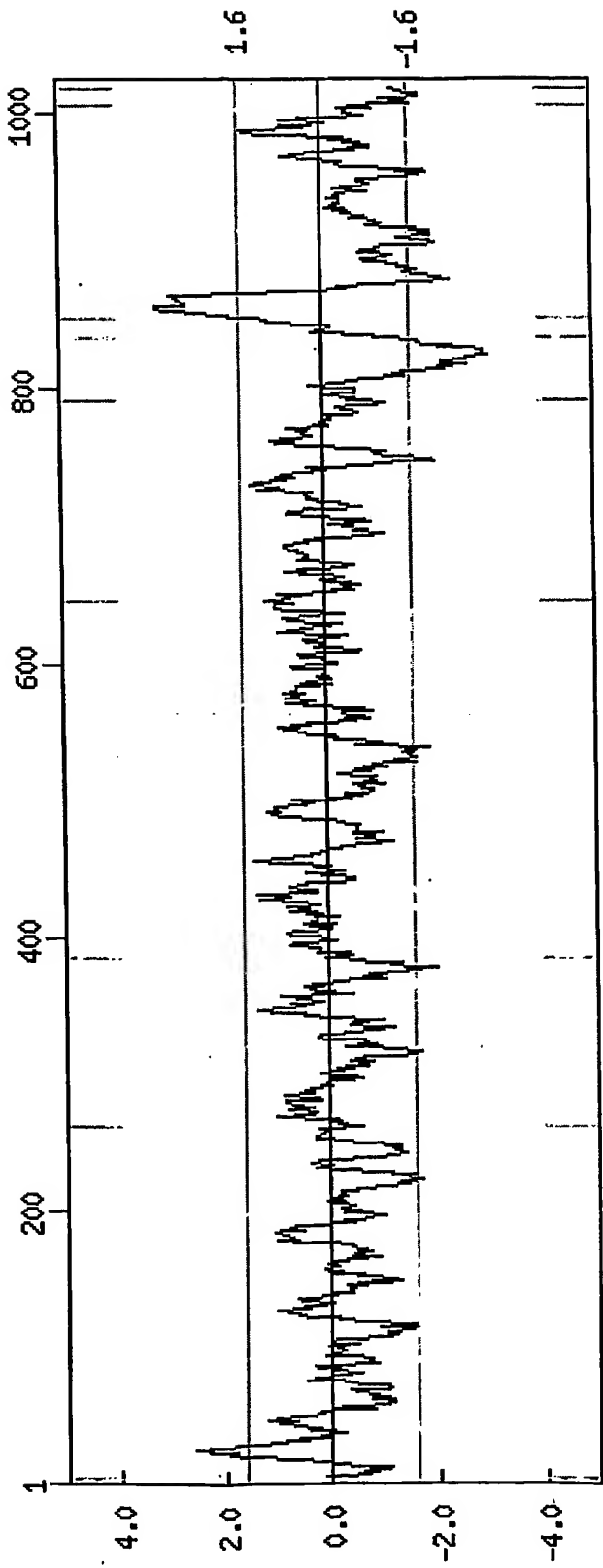
(ii) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25  
10 または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または (iii) 該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法。  
15

49. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：25  
20 または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法。

50. 癌の予防・治療剤を製造するための、(i) 請求項14もしくは請求項31記載の抗体、(ii) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：22、  
25 配列番号：25または配列番号：27で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または (iii) 該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の使用。

1/6

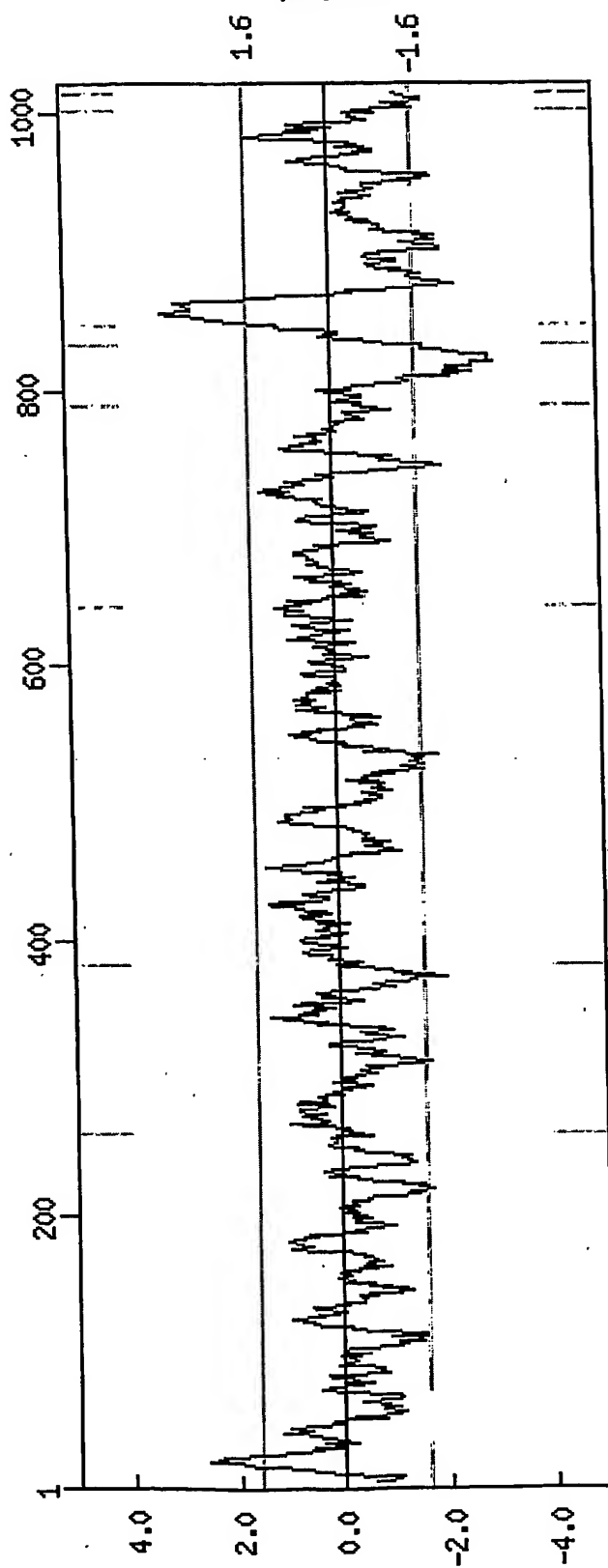
1





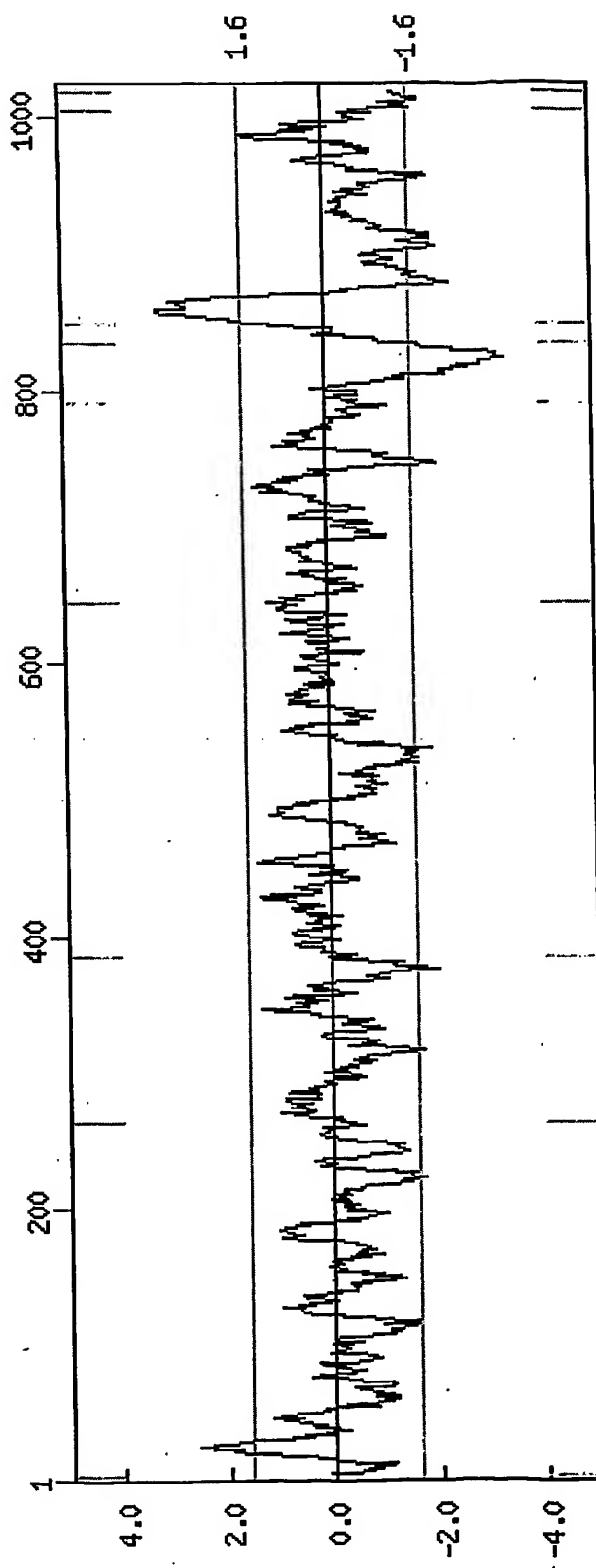
2/6

図 2



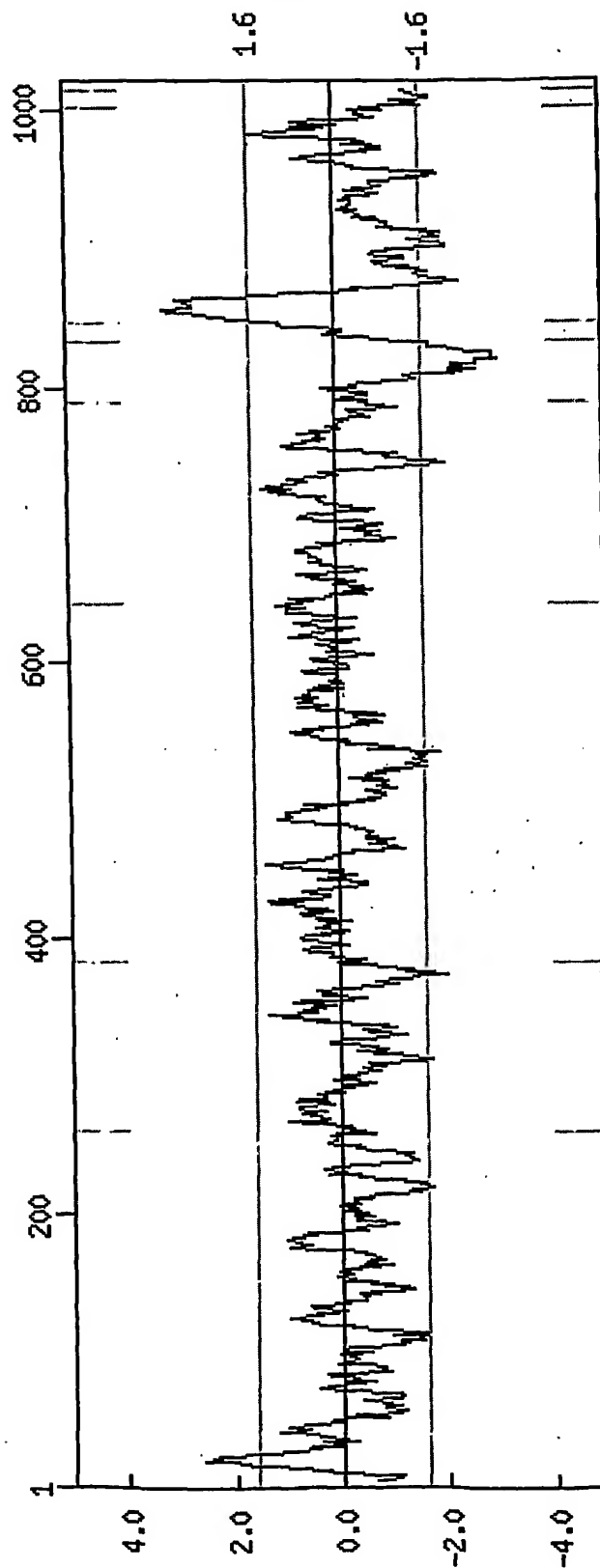
3/6

図 3



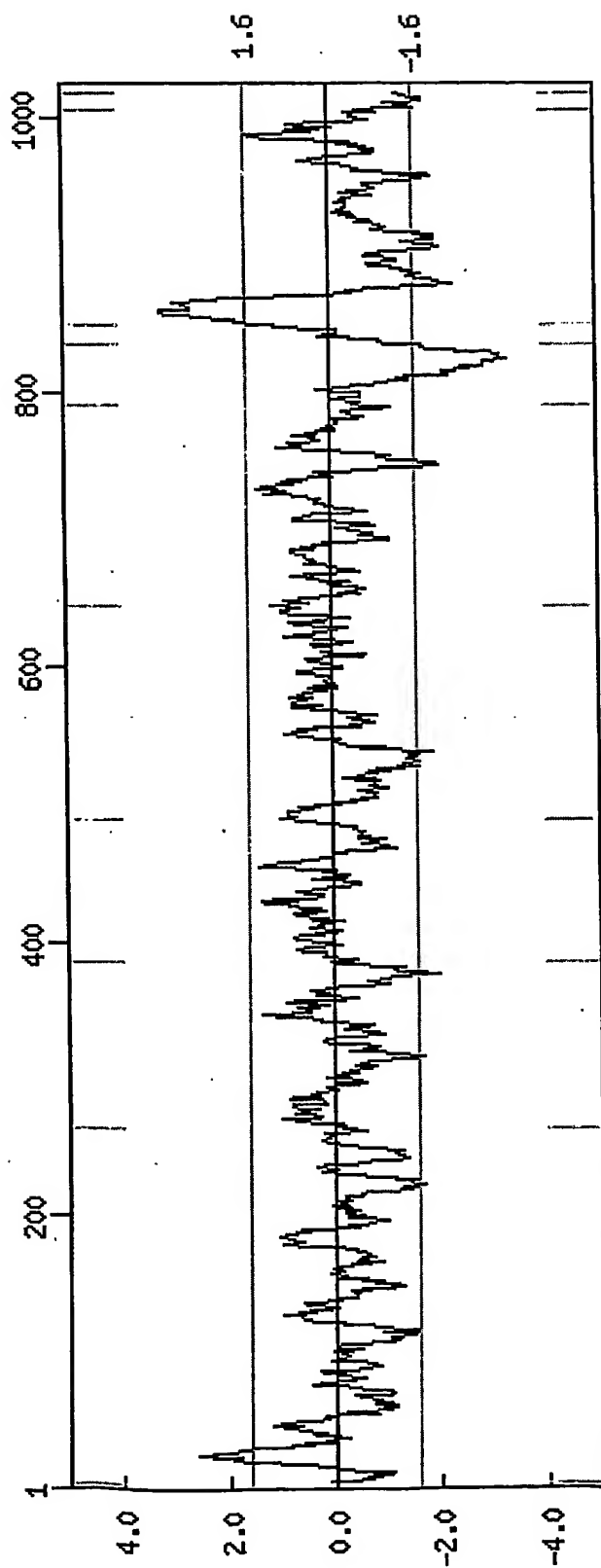
4/6

4



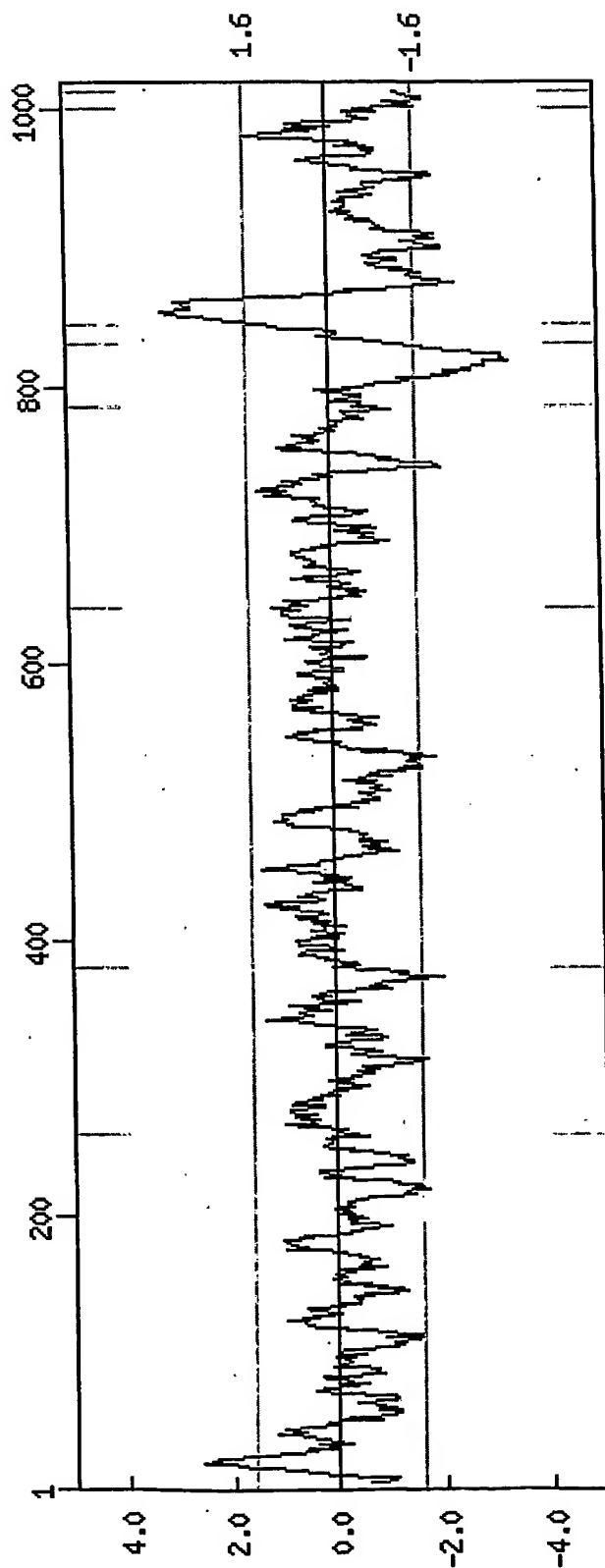
5/6

図 5



6/6

6



## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Preventing and treating agent for cancer

<130> 3079W00P

<150> JP2002-240830

<151> 2002-8-21

<150> JP2002-363108

<151> 2002-12-13

<160> 44

<210> 1

<211> 774

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Cys Ala Arg Met Ala Gly Arg Thr Arg Ala Ala Pro Arg Gly Pro

5 10 15

Tyr Gly Pro Trp Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Asp Val Val

20 25 30

Arg Val Asp Cys Gly Gln Ala Pro Leu Asp Pro Val Tyr Leu His Val

35 40 45

Thr Ala Ala Arg Pro Ala Gln Pro Thr Leu Trp Thr Ala Lys Leu Asp

50 55 60

Arg Phe Lys Gly Ser Arg His His Thr Thr Leu Ile Thr Cys His Arg

65 70 75 80

Ala Gly Leu Thr Glu Pro Asp Ser Ser Ser Pro Leu Glu Leu Ser Glu

85 90 95

Phe Leu Trp Val Asp Phe Val Val Glu Asn Ser Thr Gly Gly Gly Val  
100 105 110

Ala Val Thr Arg Pro Val Thr Trp Gln Leu Glu Tyr Pro Gly Gln Ala  
115 120 125

Pro Glu Ala Glu Lys Asp Lys Met Val Trp Glu Ile Leu Val Ser Glu  
130 135 140

Arg Asp Ile Arg Ala Leu Ile Pro Leu Ala Lys Ala Glu Glu Leu Val  
145 150 155 160

Asn Thr Ala Pro Leu Thr Gly Val Pro Gln His Val Pro Val Arg Leu  
165 170 175

Val Thr Val Asp Gly Gly Gly Ala Leu Val Glu Val Thr Glu His Val  
180 185 190

Gly Cys Glu Ser Ala Asn Thr Gln Val Leu Gln Val Ser Glu Ala Cys  
195 200 205

Asp Ala Val Phe Val Ala Gly Lys Glu Ser Arg Gly Ala Arg Gly Val  
210 215 220

Arg Val Asp Phe Trp Trp Arg Arg Leu Arg Ala Ser Leu Arg Leu Thr  
225 230 235 240

Val Trp Ala Pro Leu Leu Pro Leu Arg Ile Glu Leu Thr Asp Thr Thr  
245 250 255

Leu Glu Gln Val Arg Gly Trp Arg Val Pro Gly Pro Ala Glu Gly Pro  
260 265 270

Ala Glu Pro Ala Ala Glu Ala Ser Asp Glu Ala Glu Arg Arg Ala Arg  
275 280 285

Gly Cys His Leu Gln Tyr Gln Arg Ala Gly Val Arg Phe Leu Ala Pro  
290 295 300

Phe Ala Ala His Pro Leu Asp Gly Gly Arg Arg Leu Thr His Leu Leu  
305 310 315 320

Gly Pro Asp Trp Leu Leu Asp Val Ser His Leu Val Ala Pro His Ala

325	330	335	
Arg Val Leu Asp Ser Arg Val Ala Ser Leu Glu Gly Gly Arg Val Val			
340	345	350	
Val Gly Arg Glu Pro Gly Val Thr Ser Ile Glu Val Arg Ser Pro Leu			
355	360	365	
Ser Asp Ser Ile Leu Gly Glu Gln Ala Leu Ala Val Thr Asp Asp Lys			
370	375	380	
Val Ser Val Leu Glu Leu Arg Val Gln Pro Val Met Gly Ile Ser Leu			
385	390	395	400
Thr Leu Ser Arg Gly Thr Ala His Pro Gly Glu Val Thr Ala Thr Cys			
405	410	415	
Trp Ala Gln Ser Ala Leu Pro Ala Pro Lys Gln Glu Val Ala Leu Ser			
420	425	430	
Leu Trp Leu Ser Phe Ser Asp His Thr Val Ala Pro Ala Glu Leu Tyr			
435	440	445	
Asp Arg Arg Asp Leu Gly Leu Ser Val Ser Ala Glu Glu Pro Gly Ala			
450	455	460	
Ile Leu Pro Ala Glu Glu Gln Gly Ala Gln Leu Gly Val Val Val Ser			
465	470	475	480
Gly Ala Gly Ala Glu Gly Leu Pro Leu His Val Ala Leu His Pro Pro			
485	490	495	
Glu Pro Cys Arg Arg Gly Arg His Arg Val Pro Leu Ala Ser Gly Thr			
500	505	510	
Ala Trp Leu Gly Leu Pro Pro Ala Ser Thr Pro Ala Pro Ala Leu Pro			
515	520	525	
Ser Ser Pro Ala Trp Ser Pro Pro Ala Thr Glu Ala Thr Met Gly Gly			
530	535	540	
Lys Arg Gln Val Ala Gly Ser Val Gly Gly Asn Thr Gly Val Arg Gly			
545	550	555	560



Lys Phe Glu Arg Ala Glu Glu Glu Ala Arg Lys Glu Glu Thr Glu Ala

565

570

575

Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Met Val Pro Ala Pro Gln

580

585

590

His Val Thr Glu Leu Glu Leu Gly Met Tyr Ala Leu Leu Gly Val Phe

595

600

605

Cys Val Ala Ile Phe Ile Phe Leu Val Asn Gly Val Val Phe Val Leu

610

615

620

Arg Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Pro Asp Ser Ala Thr Asp Pro Thr Ser

625

630

635

640

Pro Gln Pro His Asn Trp Val Trp Leu Gly Thr Asp Gln Glu Glu Leu

645

650

655

Ser Arg Gln Leu Asp Arg Gln Ser Pro Gly Pro Pro Lys Gly Glu Gly

660

665

670

Ser Cys Pro Cys Glu Ser Gly Gly Gly Gly Glu Ala Pro Thr Leu Ala

675

680

685

Pro Gly Pro Pro Gly Gly Thr Thr Ser Ser Ser Ser Thr Leu Ala Arg

690

695

700

Lys Glu Ala Gly Gly Arg Arg Lys Arg Val Glu Phe Val Thr Phe Val

705

710

715

720

Pro Ala Pro Pro Ala Gln Ser Pro Glu Glu Pro Val Gly Ala Pro Ala

725

730

735

Val Gln Ser Ile Leu Val Ala Gly Glu Glu Asp Ile Arg Trp Val Cys

740

745

750

Glu Asp Met Gly Leu Lys Asp Pro Glu Glu Leu Arg Asn Tyr Met Glu

755

760

765

Arg Ile Arg Gly Ser Ser

770

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2322

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

```
atgtgcgcgc ggatggccgg tgcacaaga gcgccccc cggggccctt cggccccc tgg 60
ctctgcctcc tggtagccct cgccctggac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc 120
ctggaccctg tctacctgca tgtgacagcc gcccgcccag cccagcccac actctggact 180
gccaagctag accgcttcaa gggctccagg caccacacca cctcatcac ctgccaccgt 240
gctgggctca cagagccaga ticcagcagt ccccttgaac tgtctgagtt cctatgggtg 300
gactttgtgg tggagaatag cactgggtggg ggcgtagcgg tcactcgccc cgtcacgtgg 360
cagctggagt acccaggcca ggcccctgaa gcagagaagg acaaaatggt gtgggaaatc 420
ctggtgtctg agcgggacat cagagccctt atcccactgg ccaaggctga ggagctgggt 480
aatacagcac cactgactgg agtgccccag catgtccccg tgcgccttgt cactgtggac 540
ggcggggggg ccttgggtga ggtgacagag catgtcggct gcgagtcgc caacacacag 600
gtcctgcagg tgtctgaggc ctgtgatgcc gtgttcgtgg ctggcaagga gagccggggc 660
gcccgggggg tgcgagtga cttctggtag cgccggctcc gcgcctcgt gcggctgacc 720
gtgtggggcc cgctgctacc gctgcgtatc gagctcaccg acaccacct cgagcaggtc 780
cgcggctgga gggtagctgg cctgtctgaa gggcctgcgg aaccgcgtgc agaggcgtca 840
gatgaggccg agcggcgccg ccgtggctgc caccgtcagt accagcgggc cgggtgtgcgc 900
ttcctcgccc ccttcgcggc ccaccgcgtg gacggcggcc gccgcctcac gcacctgctt 960
ggccccgact ggctgctaga cgtgtccac ctcgtggcgc cacacgcccg cgtgtctggac 1020
tcgcgtgtag cctctctgga gggtagccgt gtcgtggtgg gccgggagcc cgggtgtcacc 1080
tccattgagg tgcgttcccc actgtctgac tccatcctgg gggagcaggc gctggctgtg 1140
acggacgaca aggtctcagt gctggagctg aggggtgcagc cagtgatggg catctcgctg 1200
accttagacc ggggcactgc ccacccggg gaggtcacag ctacgtgctg ggcacagtca 1260
gcccttcccc ccccaaagca ggaggtagcc ctctccctat ggctgtcctt ctctgatcac 1320
actgtggccc cagctgagct ctacgaccgc cgtgacctgg gactgtccgt ctacgcccag 1380
gagcctgggt ccatcctgcc agctgaggag cagggtgccc agctcggggt ggtgggtgagt 1440
```

```

ggggcaggcg ccgaggggct gccgctgcat gtggctctgc acccgcccga gcccitgccg 1500
cggggccgcc accgigtgcc tctggcctct ggcaccgcct ggctggggct gccccitgcc 1560
tccactccag cccctgctct cccatccagc cctgcttga gccaccagc cacagaagcc 1620
accatgggtg glaaacggca ggtggcaggc agtgtcgggg gcaacacagg tgtgaggggc 1680
aagttitgagc gggcagagga ggaggccagg aaggaggaga ccgaagccag ggaggaggag 1740
gaggaagagg aggaggagat ggtccctgcc cctcagcatg tcactgagct agagctgggc 1800
atgtacgcc tgctgggagt ctctgcgtg gccatcttca tcttcttggc caatggigtg 1860
gtcttcgtcc tgcgctatca gcgcaaagaa cctcccgaca gtgccactga cccaccctcc 1920
ccccagcccc acaactgggt ctggctgggc actgaccagg aggaactgag ccgccagctg 1980
gaccggcagt cccctggccc gcccaagggg gaggggagct gcccctgtga gagtggggga 2040
ggaggggagg cccctaccct ggccccitggc cctcctgggg gcaccaccag ctctcaagc 2100
accctggccc gaaaggaggc tggggggcgg cggaagcgag tagagtittg gacattitg 2160
ccagccccctc cagcccagtc acctgaggag cctgtagggg cccctgctgt gcagtccatc 2220
cttgggcag gcgaggagga catccgctgg gtgtgtgagg acatggggct gaaggacct 2280
gaggagcttc gcaactacat ggagaggatc cggggcagct cc 2322

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2755

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

```

attgtctggg aattgcagcc gcggggcggg cggcggcggc ggcgggcggc gccgggaccc 60
agcgggccag gtggggacgg cgcggagcgg gtgcgggaga tgccgtgcgg gactggggcc 120
acctgagccg cccgcctcgt ccccgccctc tgtgggaagg atgtgcgcgc ggatggccgg 180
tcgcacaaga gcggccccctc gggggcccta cggccccitgg ctctgcctcc tgggtggccct 240
cgccctggac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc ctggaccctg tctacctga 300
tgtgacagcc gcccgcccag cccagcccac actctggact gccaaagctag accgcitcaa 360
gggctccagg caccacacca cctcatcac ctgccaccgt gctgggctca cagagccaga 420
tccagcagt ccccttgaac tgtctgagtt cctatgggtg gactttgtgg tggagaatag 480

```

cactggtaggg ggcgtagcgg tcactcgccc cgtcacgtgg cagctggagt acccaggcca 540  
ggcccttgaa gcagagaagg acaaaaiggt gtgggaaatc ctgggtgctg agcgggacat 600  
cagagccctt atcccactgg ccaaggctga ggagctgggtg aatacagcac cactgactgg 660  
agtgcctcag catgtcccg tgcgccttgt cactgtggac ggcggggggg ccttgggtga 720  
ggtagacagag catgtcggct gcgagtcgtc caacacacag gtccctgcagg tgtctgaggc 780  
ctgtgatgcc gtgttcgtgg ctggcaagga gagccggggc gcccgggggg tgcgagtga 840  
cttctgggtg cgcgggtcc gcgcctcgt gcggctgacc gtgtgggcc cgctgctacc 900  
gctgcgtatc gagctaccg acaccacct cgagcaggtc cgcggctgga gggtacctgg 960  
ccctgctgaa gggcctgcgg aaccgcgtc agaggcgta gatgaggccg agcggcgcc 1020  
ccgtggctgc cactgcagt accagcgggc cgggtgtgcg ttcctcgccc ctttcgggc 1080  
ccaccgcgtg gacggcggcc gccgcctcac gcacctgtt ggccccgact ggctgctaga 1140  
cgtgtccac ctctgggcg cacacgccc cgctgtggac tcgctgtag cctctctgga 1200  
gggtggccgt gtcgtgggtg gccgggagcc cgggtgcacc tccattgagg tgcgttccc 1260  
actgtctgac tccatcctgg gggagcaggc gctggctgtg acggacgaca aggtctcagt 1320  
gctggagctg aggggtgcagc cagtgtggg catctcgtg accttgagcc ggggcactgc 1380  
ccacccggg gaggtcacag ctacgtgtg ggcacagtca gcccttccc ccccaaagca 1440  
ggaggtggcc ctctccctat ggctgtcctt ctctgacac actgtggccc cagctgagct 1500  
ctacgaccgc cgtgacctg gactgtcgt ctacccgag gagcctgggt ccatcctgcc 1560  
agctgaggag cagggtgccc agctcgggt ggtggtgagt ggggcaggcg ccgaggggt 1620  
gccgtgcat gtggctctgc accgcccga gccctgccg cggggccgcc accgtgtgcc 1680  
ctggccctt ggcaccgct ggctggggct gcccctgcc tccactccag cccctgctt 1740  
cccatccagc cctgcttga gccaccagc cacagaagcc accatgggtg gtaaaccgca 1800  
ggtagcaggc agtgcgggg gcaacacagg tgtgaggggc aagtttgagc gggcagagga 1860  
ggaggccagg aaggaggaga ccgaagccag ggaggaggag gaggaagagg aggaggagt 1920  
ggtccctgcc cctcagcatg tcactgagct agagctgggc atgtacgcc tgcgtggagt 1980  
cttctcgtg gccatctta tcttcttggt caatggtgtg gtcttcgtc tgcgtatca 2040  
gcgcaaagaa cctcccgaca gtgccactga cccacctcc cccagcccc acaactgggt 2100  
ctggctgggc actgaccagg aggaactgag ccgccagctg gaccggcagt cccctggccc 2160  
gccaagggg gaggggagct gcccctgtga gattggggga ggaggggagg cccctacct 2220

ggccccctggc cctcctgggg gcaccaccag ctctctcaagc accctggccc gaaaggaggc 2280  
 tggggggcgg cggaagcgag tagagtittgt gacattitgt ccagcccctc cagcccagtc 2340  
 acctgaggag cctgtagggg cccctgtctgt gcagtcctc cttgtggcag gcgaggagga 2400  
 catccgctgg gigtgtgagg acatggggct gaaggaccct gaggagcttc gcaactacat 2460  
 ggagaggatc cggggcagct cctgaccctc cacagccacc tggtcagcca ccagctgggg 2520  
 caacgagggt ggaggtccca ctgagcctct cgccctgccc cgccactcgt ctgggtgcttg 2580  
 ttgatccaag tccccctgcct ggccccccac aaggactccc atccaggccc cctctgccct 2640  
 gcccttgtc atggaccatg gtcgtgagga agggctcatg ccccttattt atgggaacca 2700  
 tctcattcta acagaataaa ccgagaagga aaccagaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2755

<210> 4

<211> 909

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met	Cys	Ala	Arg	Met	Ala	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro
				5					10					15	
Tyr	Gly	Pro	Trp	Leu	Cys	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Asp	Val	Val
				20					25					30	
Arg	Val	Asp	Cys	Gly	Gln	Ala	Pro	Leu	Asp	Pro	Val	Tyr	Leu	Pro	Ala
				35				40					45		
Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Ala	Pro	Glu	His	Phe	Arg	Val	Gln	Gln	Val
				50				55					60		
Gly	His	Tyr	Pro	Pro	Ala	Asn	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	Glu	Thr
				65				70				75		80	
Phe	Leu	Leu	Leu	Gln	Pro	Trp	Pro	Arg	Ala	Gln	Pro	Leu	Leu	Arg	Ala
				85				90						95	
Ser	Tyr	Pro	Pro	Phe	Ala	Thr	Gln	Gln	Val	Val	Pro	Pro	Arg	Val	Thr
				100				105						110	

9/78

Glu Pro His Gln Arg Pro Val Pro Trp Asp Val Arg Ala Val Ser Val  
115 120 125

Glu Ala Ala Val Thr Pro Ala Glu Pro Tyr Ala Arg Val Leu Phe His  
130 135 140

Leu Lys Gly Gln Asp Trp Pro Pro Gly Ser Gly Ser Leu Pro Cys Ala  
145 150 155 160

Arg Leu His Ala Thr His Pro Ala Gly Thr Ala His Gln Ala Cys Arg  
165 170 175

Phe Gln Pro Ser Leu Gly Ala Cys Val Val Glu Leu Glu Leu Pro Ser  
180 185 190

His Trp Phe Ser Gln Ala Ser Thr Thr Arg Ala Glu Leu Ala Tyr Thr  
195 200 205

Leu Glu Pro Ala Ala Glu Gly Pro Gly Gly Cys Gly Ser Gly Glu Glu  
210 215 220

Asn Asp Pro Gly Glu Gln Ala Leu Pro Val Gly Gly Val Glu Leu Arg  
225 230 235 240

Pro Ala Asp Pro Pro Gln Tyr Gln Glu Val Pro Leu Asp Glu Ala Val  
245 250 255

Thr Leu Arg Val Pro Asp Met Pro Val Arg Pro Gly Gln Leu Phe Ser  
260 265 270

Ala Thr Leu Leu Leu Arg His Asn Phe Thr Ala Ser Leu Leu Thr Leu  
275 280 285

Arg Ile Lys Val Lys Lys Gly Leu His Val Thr Ala Ala Arg Pro Ala  
290 295 300

Gln Pro Thr Leu Trp Thr Ala Lys Leu Asp Arg Phe Lys Gly Ser Arg  
305 310 315 320

His His Thr Thr Leu Ile Thr Cys His Arg Ala Gly Leu Thr Glu Pro  
325 330 335

Asp Ser Ser Pro Leu Glu Leu Ser Glu Phe Leu Trp Val Asp Phe Val

10/78

340 345 350  
Val Glu Asn Ser Thr Gly Gly Gly Val Ala Val Thr Arg Pro Val Thr  
355 360 365  
Trp Gln Leu Glu Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Glu Ala Glu Lys Asp Lys  
370 375 380  
Met Val Trp Glu Ile Leu Val Ser Glu Arg Asp Ile Arg Ala Leu Ile  
385 390 395 400  
Pro Leu Ala Lys Ala Glu Glu Leu Val Asn Thr Ala Pro Leu Thr Gly  
405 410 415  
Val Pro Gln His Val Pro Val Arg Leu Val Thr Val Asp Gly Gly Gly  
420 425 430  
Ala Leu Val Glu Val Thr Glu His Val Gly Cys Glu Ser Ala Asn Thr  
435 440 445  
Gln Val Leu Gln Val Ser Glu Ala Cys Asp Ala Val Phe Val Ala Gly  
450 455 460  
Lys Glu Ser Arg Gly Ala Arg Gly Val Arg Val Asp Phe Trp Trp Arg  
465 470 475 480  
Arg Leu Arg Ala Ser Leu Arg Leu Thr Val Trp Ala Pro Leu Leu Pro  
485 490 495  
Leu Arg Ile Glu Leu Thr Asp Thr Thr Leu Glu Gln Val Arg Gly Trp  
500 505 510  
Arg Val Pro Gly Pro Ala Glu Gly Pro Ala Glu Pro Ala Ala Glu Ala  
515 520 525  
Ser Asp Glu Ala Glu Arg Arg Ala Arg Gly Cys His Leu Gln Tyr Gln  
530 535 540  
Arg Ala Gly Val Arg Phe Leu Ala Pro Phe Ala Ala His Pro Leu Asp  
545 550 555 560  
Gly Gly Arg Arg Leu Thr His Leu Leu Gly Pro Asp Trp Leu Leu Asp  
565 570 575

Val Ser His Leu Val Ala Pro His Ala Arg Val Leu Asp Ser Arg Val  
580 585 590

Ala Ser Leu Glu Gly Gly Arg Val Val Val Gly Arg Glu Pro Gly Val  
595 600 605

Thr Ser Ile Glu Val Arg Ser Pro Leu Ser Asp Ser Ile Leu Gly Glu  
610 615 620

Gln Ala Leu Ala Val Thr Asp Asp Lys Val Ser Val Leu Glu Leu Arg  
625 630 635 640

Val Gln Pro Val Met Gly Ile Ser Leu Thr Leu Ser Arg Gly Thr Ala  
645 650 655

His Pro Gly Glu Val Thr Ala Thr Cys Trp Ala Gln Ser Ala Leu Pro  
660 665 670

Ala Pro Lys Gln Glu Val Ala Leu Ser Leu Trp Leu Ser Phe Ser Asp  
675 680 685

His Thr Val Ala Pro Ala Glu Leu Tyr Asp Arg Arg Asp Leu Gly Leu  
690 695 700

Ser Val Ser Ala Glu Glu Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ala Glu Glu Gln  
705 710 715 720

Gly Ala Gln Leu Gly Val Val His Val Thr Glu Leu Glu Leu Gly Met  
725 730 735

Tyr Ala Leu Leu Gly Val Phe Cys Val Ala Ile Phe Ile Phe Leu Val  
740 745 750

Asn Gly Val Val Phe Val Leu Arg Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Pro Asp  
755 760 765

Ser Ala Thr Asp Pro Thr Ser Pro Gln Pro His Asn Trp Val Trp Leu  
770 775 780

Gly Thr Asp Gln Glu Glu Leu Ser Arg Gln Leu Asp Arg Gln Ser Pro  
785 790 795 800

Gly Pro Pro Lys Gly Glu Gly Ser Cys Pro Cys Glu Ser Gly Gly Gly



12/78

805 810 815  
Gly Glu Ala Pro Thr Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gly Gly Thr Thr Ser  
820 825 830  
Ser Ser Ser Thr Leu Ala Arg Lys Glu Ala Gly Gly Arg Arg Lys Arg  
835 840 845  
Val Glu Phe Val Thr Phe Ala Pro Ala Pro Pro Ala Gln Ser Pro Glu  
850 855 860  
Glu Pro Val Gly Ala Pro Ala Val Gln Ser Ile Leu Val Ala Gly Glu  
865 870 875 880  
Glu Asp Ile Arg Trp Val Cys Glu Asp Met Gly Leu Lys Asp Pro Glu  
885 890 895  
Glu Leu Arg Asn Tyr Met Glu Arg Ile Arg Gly Ser Ser  
900 905

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2727

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

atgtgcgcgc ggaatggccgg tcgcacaaca gcgccccctc gggggcccta cggccccctgg 60  
ctctgcctcc tggtagccct cgccctggac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc 120  
ctggaccctg tctacctgcc ggcagccctg gagctcctag acgcccccta acacttccgt 180  
gtgcagcagg tgggccacta cccacctgcc aactcctctc tgagctcccg atctgagacc 240  
tttctgctcc tacagccctg gccagggcc cagccacttc tccgggcctc ctaccacct 300  
tttgccactc agcaggtggt ccccccctga gtcactgagc cccaccaacg gccagtccca 360  
tgggacgtgc gggccgtttc agtgggaagcg gctgtgactc cagcagagcc ctacgcccgg 420  
gttctcttcc acctcaaagg gcaggatigg ccaccagggt ctggcagcct gccctgtgcc 480  
cggctccatg ccacacacc tgccggcact gctaccaag cctgccgctt ccagccatcc 540  
ctggggcgct gcgtggtgga gctggagctt cctcgcact ggctctcaca ggctccacc 600

acacgggccc agctggccta cacgcttgag cctgcagctg agggccctgg gggctgtggc 660  
tccggcgagg agaacgaccc tggggagcag gccctcccag tggggggtgt ggagctgcgc 720  
ccagcagacc ccccgagta ccaggaggta cctctggacg aggtctgtac tctgcgggtg 780  
cctgacatgc cagtcgggcc cggccagctc tttagtgcta ccctcctgt tggcacaac 840  
ttcacagcca gcctcctgac cctgcggatc aaggigaaga aggggctgca tgtgacagcc 900  
gcccgccag ccagccccc acctcggact gccaagctgg accgcttcaa gggctccagg 960  
caccacacca ccctcatcac ctgccaccgt gctgggctca cagagccaga ttccagtcct 1020  
cttgaactgt ctgagttcct atgggtggac tttgtggtgg agaatagcac tgggtggggc 1080  
gtagcgggtca ctgccccgt cacgtggcag ctggagtacc caggccaggc ccctgaagca 1140  
gagaaggaca aaatgggtgt ggaaatcctg gtgtctgagc gggacatcag agccctatc 1200  
ccactggcca aggttgagga gctgggtgaat acagcaccac tgactggagt gcccagcat 1260  
gtccccgtgc gcctgtcac tgtggacggc gggggggcct tgggtggaggt gacagagcat 1320  
gtcggctgcg agcttgccaa cacacaggct ctgcagggtgt ctgaggcctg tgaatccgtg 1380  
ttcgtggctg gcaaggagag ccggggcgcc cgggggggtgc gagtggactt ctggtggcgc 1440  
cggctccgcg cctcgctgcg gctgaccgtg tgggcccccc tgctaccgt gcgtatcgag 1500  
ctcaccgaca ccacctcga gcaggctcgc ggctggaggg tacctggccc tgctgaaggg 1560  
cctgcggaac ccgtgcaga ggcgtcggat gaggccgagc ggcgcgcccg tggctgccac 1620  
ctgcagtacc agcgggcccg tgtgcgttc ctgccccct tcgcgccca cccgtggac 1680  
ggcgccgcc gcctcacga cctgttggc cccgactggc tgctagacgt gtcccacctc 1740  
gtggcgccac acgcccgcgt gctggactcg cgtgtagcct ctctggaggg tggccgtgtc 1800  
gtgggtgggc gggagcccgg tgtcacctcc attgaggtgc gtccccact gtctgactcc 1860  
atcctggggg agcaggcgct ggctgtgacg gacgacaagg tctcagtgtt ggagctgagg 1920  
gtgcagccag tgatgggcat ctgctgacc ttgagccggg gcactgcca cccggggag 1980  
gtcacagcta cgtgctgggc acagtcagcc cttcccgccc caaagcagga ggtggccctc 2040  
tcctatggc tgtccttctc tgatcacact gtggccccag ctgagctcta cgaccgccgt 2100  
gacctgggac tgtccgtctc agccgaggag cctgggtgcca tcctgccagc tgaggagcag 2160  
ggtgcccagc tgggggtgt gcatgtact gagctagagc tgggcatgta cgcctgtctg 2220  
ggagtcttct gcgtggccat cttcatctc ttgggtcaatg gtgtggctctt cgtcctgcgc 2280  
tatcagcgca aagaacctcc cgacagtgc actgaccca cctccccca gcccacaaac 2340

tgggtctggc tgggcactga ccaggaggaa ctgagccgcc agctggaccg gcagtcacct 2400  
 ggccccccca agggggaggg gagctgcccc tgtgagagtg ggggaggagg ggaggcccc 2460  
 accctggccc ctggcccicc tgggggcacc accagctcct caagcacctt ggcccgaag 2520  
 gaggctgggg ggcggcgga gcgagtagag ttgtgacat ttgcgccagc cctccagcc 2580  
 cagtcacctg aggagcctgt aggggcccc gctgtgcagt ccatccttgt ggcaggcgag 2640  
 gaggacatcc gctgggtgtg tgaggacatg gggctgaagg accctgagga gcttcgcaac 2700  
 tacatggaga ggatccgggg cagctcc 2727

<210> 6

<211> 2778

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

ctggggccac ctgagccgcc cgcctcgtcc ccgccttctg tgggaaggat gtgcgcgcgg 60  
 atggccggtc gcacaacagc ggccccctcg gggccctacg gcccctggct ctgcctcctg 120  
 gtggccctcg ccttgacgt cgtgagagt gactgtggcc aggcctcccc ggacctgtc 180  
 tacctgccgg cagccctgga gctcctagac gcccctgaac acttccgtgt gcagcaggtg 240  
 ggccactacc cactigccaa ctctctctg agctcccgat ctgagacctt tctgctccta 300  
 cagcccctggc ccaggggcca gccacttctc cgggcctcct acccaccttt tgcactcag 360  
 caggctggcc cccctcgagt cactgagccc caccaacggc cagtcctatg ggacgtgcgg 420  
 gccgtttcag tggaaagcgc tgtgactcca gcagagccct acgcccgggt tctcttccac 480  
 ctcaaagggc aggatggcc accagggtct ggcagcctgc cctgtgcccg gctccatgcc 540  
 acacaccttg ccggcactgc tcaccaagcc tgccgttcc agccatccct gggcgctgc 600  
 gtgggtggagc tggagcttcc ctgcactgg ttctcacagg cctccaccac acgggcccag 660  
 ctggcctaca cgcttgagcc tgcagctgag ggccctgggg gctgtggctc cggcgaggag 720  
 aacgaccttg gggagcaggc cctcccagtg ggggggtgtg agctgcgccc agcagacccc 780  
 ccgcagtacc aggaggtacc tctggacgag gctgtgactc tgcgggtgcc tgacatgcca 840  
 gtgcggcccc gccagctctt tagtgctacc ctctgtctc ggcacaactt cacagccagc 900  
 ctctgaccc tgcggatcaa ggtgaagaag gggctgcatg tgacagccgc ccgcccagcc 960

cagccacac tctggactgc caagctggac cgcttcaagg gctccaggca ccacaccacc 1020  
ctcatcacct gccaccgtgc tgggctcaca gagccagatt ccagtcacct tgaactgtct 1080  
gagttcctat ggggtggactt tgigggtggag aatagcactg gtgggggctg agcggticact 1140  
cgccccgtca cgtggcagct ggagtlacca ggccaggccc ctgaagcaga gaaggacaaa 1200  
atggtgtggg aaatcctggt gictgagcgg gacatcagag cccttatccc actggccaag 1260  
gctgaggagc tggatgaatac agcaccactg actggagtgc cccagcatgt ccccgctgcgc 1320  
cttgtcactg tggacggcgg gggggccttg gtggaggatga cagagcatgt cggctgcgag 1380  
tctgccaaca cacaggctct gcagggtgtct gaggcctgtg atgccgtgtt cgtggctggc 1440  
aaggagagcc gggggcggcg ggggggtgca gaggacttct ggtggcgccg gctccgcgcc 1500  
tcgctgcggc tgaccgtgtg ggccccctg ctaccgtgc gtatcgagct caccgacacc 1560  
accctcgagc aggtccgcgg ctggagggtta cctggccctg ctgaaggggc tgcggaacct 1620  
gctgcagagg cgtcggatga ggccgagcgg cgcgcccgtg gctgccacct gcagtaccag 1680  
cgggcccgtg tgcgttctt cgccccctc gcggcccacc cgctggacgg cggccgcccgc 1740  
ctcacgcacc tgcttggccc cgactggctg ctagacgtgt cccacctgt ggcgccacac 1800  
gcccgcgtgc tggactcgcg ttagcctct ctggagggtg gccgtgtgt ggtgggcccgg 1860  
gagccccgtg tcacctcat taggtgcgt tccccactgt ctgactccat cctgggggag 1920  
caggcgctgg ctgtacgga cgacaaggtc tcagtgtctg agctgagggt gcagccagt 1980  
atgggcatct cgctgacctt gagccggggc actgcccacc ccggggagggt cacagctacg 2040  
tgctgggcac agtcagccct tccgccccca aagcaggagg tggccctct cctatggctg 2100  
tccttctctg atcacactgt ggccccagct gagctctacg accgccgtga cctgggactg 2160  
tccgtctcag ccgaggagcc tggtgccatc ctgccagctg aggagcaggg tgcccagctc 2220  
ggggtgggtc atgtcactga gctagagctg ggcatgtacg ccttcttggg agtcttctgc 2280  
gtggccatct tcatttctt ggtcaatggt gtggtcttcg tcttgcgta tcagcgcaaa 2340  
gaacctcccg acagtgccac tgaccccacc tccccccagc cccacaactg ggtctggctg 2400  
ggcactgacc aggaggaact gagccgccag ctggaccggc agtcccctgg cccgccaag 2460  
ggggagggga gctgcccctg tgagagtggg ggaggagggg aggcccctac cctggcccct 2520  
ggccctcctg ggggcaccac cagctcttca agcaccctgg cccgaaagga ggctgggggg 2580  
cggcggaagc gagtagagtt tgtgacattt gcgccagccc ctccagcca gtcacctgag 2640  
gagcctgtag gggccccctg tgtgcagtc atccttgtgg caggcgagga ggacatccgc 2700

tgggtgigtg aggacatggg gctgaaggac cctgaggagc ttgcgaacta catggagagg 2760  
atccggggca gctcctga 2778

<210> 7

<211> 594

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met Cys Ala Arg Met Ala Gly Arg Thr Thr Ala Ala Pro Arg Gly Pro

5 10 15

Tyr Gly Pro Trp Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Asp Val Val

20 25 30

Arg Val Asp Cys Gly Gln Ala Pro Leu Asp Pro Gly Leu His Val Thr

35 40 45

Ala Ala Arg Pro Ala Gln Pro Thr Leu Trp Thr Ala Lys Leu Asp Arg

50 55 60

Phe Lys Gly Ser Arg His His Thr Thr Leu Ile Thr Cys His Arg Ala

65 70 75 80

Gly Leu Thr Glu Pro Asp Ser Ser Ser Pro Leu Glu Leu Ser Glu Phe

85 90 95

Leu Trp Val Asp Phe Val Val Glu Asn Ser Thr Gly Gly Gly Val Ala

100 105 110

Val Thr Arg Pro Val Thr Trp Gln Leu Glu Tyr Pro Gly Gln Ala Pro

115 120 125

Glu Ala Glu Lys Asp Lys Met Val Trp Glu Ile Leu Val Ser Glu Arg

130 135 140

Asp Ile Arg Ala Leu Ile Pro Leu Ala Lys Ala Glu Glu Leu Val Asn

145 150 155 160

Thr Ala Pro Leu Thr Gly Val Pro Gln His Val Pro Val Arg Leu Val

165	170	175	
Thr Val Asp Gly Gly Gly Ala Leu Val Glu Val Thr Glu His Val Gly			
180	185	190	
Cys Glu Ser Ala Asn Thr Gln Val Leu Gln Val Ser Glu Ala Cys Asp			
195	200	205	
Ala Val Phe Val Ala Gly Lys Glu Ser Arg Gly Ala Arg Gly Val Arg			
210	215	220	
Val Asp Phe Trp Trp Arg Arg Leu Arg Ala Ser Leu Arg Leu Thr Val			
225	230	235	240
Trp Ala Pro Leu Leu Pro Leu Arg Ile Glu Leu Thr Asp Thr Thr Leu			
245	250	255	
Glu Gln Val Arg Gly Trp Arg Val Pro Gly Pro Ala Glu Gly Pro Ala			
260	265	270	
Glu Pro Ala Ala Glu Ala Ser Asp Glu Ala Glu Arg Arg Ala Arg Gly			
275	280	285	
Cys His Leu Gln Tyr Gln Arg Ala Gly Val Arg Phe Leu Ala Pro Phe			
290	295	300	
Ala Ala His Pro Leu Asp Gly Gly Arg Arg Leu Thr His Leu Leu Gly			
305	310	315	320
Pro Asp Trp Leu Leu Asp Val Ser His Leu Val Ala Pro His Ala Arg			
325	330	335	
Val Leu Asp Ser Arg Val Ala Ser Leu Glu Gly Gly Arg Val Val Val			
340	345	350	
Gly Arg Glu Pro Gly Val Thr Ser Ile Glu Val Arg Ser Pro Leu Ser			
355	360	365	
Asp Ser Ile Leu Gly Glu Gln Ala Leu Ala Val Thr Asp Asp Lys Val			
370	375	380	
Ser Val Leu Glu Leu Arg Val Gln Pro Val Met Gly Ile Ser Leu Thr			
385	390	395	400

18/78

Leu Ser Arg Gly Thr Ala His Pro Gly Glu Val Thr Ala Thr Cys Trp

405

410

415

Ala Gln Ser Ala Leu Pro Ala Pro Lys Gln Glu Val Ala Leu Ser Leu

420

425

430

Trp Leu Ser Phe Ser Asp His Thr Val Ala Pro Ala Glu Leu Tyr Asp

435

440

445

Arg Arg Asp Leu Gly Leu Ser Val Ser Ala Glu Glu Pro Gly Ala Ile

450

455

460

Leu Pro Ala Glu Glu Gln Gly Ala Gln Leu Gly Val Val Val Ser Gly

465

470

475

480

Ala Gly Ala Glu Gly Leu Pro Leu His Val Ala Leu His Pro Pro Glu

485

490

495

Pro Cys Arg Arg Gly Arg His Arg Val Pro Leu Ala Ser Gly Thr Ala

500

505

510

Trp Leu Gly Leu Pro Pro Ala Ser Thr Pro Ala Pro Ala Leu Pro Ser

515

520

525

Ser Pro Ala Trp Ser Pro Pro Ala Thr Glu Ala Thr Met Gly Gly Lys

530

535

540

Arg Gln Val Ala Gly Ser Val Gly Gly Asn Thr Gly Val Arg Gly Lys

545

550

555

560

Phe Glu Arg Ala Glu Glu Glu Ala Arg Lys Glu Glu Thr Glu Ala Arg

565

570

575

Asp Gly Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Asp Gly Pro Cys Pro Ser Ala

580

585

590

Cys His

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1782

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 8

atgtgcgcgc ggatggccgg tcgcacaaca gcgccccctc gggggcccta cggccccctgg 60  
ctctgcctcc tggtagccct cgccttgac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc 120  
ctggaccctg ggctgcatgt gacagccgcc cgccagccc agcccacact ctggactgcc 180  
aagctggacc gcttcaaggc ctccaggcac cacaccacc tcatcacctg ccaccgtgct 240  
gggctcacag agccagattc cagcagtcct ctgaactgt ctgagttct atgggtggac 300  
tttgtggtag agaatagcac tggtaggggc gtagcgggtc ctgccccgt cacgtggcag 360  
ctggagtacc caggccaggc cctgaagca gagaaggaca aaatgggtgt ggaaatcctg 420  
ggtctgagc gggacatcag agcccttacc ccactggcca aggtgagga gctggtgaat 480  
acagcaccac tgactggagt gcccagcat gtccccgtgc gcctgtcac tgtggacggc 540  
gggggggcct tggtaggagt gacagagcat gtggtgtgc agtctgcca cacacagtc 600  
ctgcagggtg ctgaggcctg tgatgccgtg ttctgtggctg gcaaggagag ccggggcgcc 660  
cggggggtgc gactggactt ctggtggcgc cggctccgcg cctcgtgtgc gctgaccgtg 720  
tgggcccccc tgctaccgtg gcgtatcgag ctaccgaca ccacctcga gcaggctcgc 780  
ggctggaggg tacctggccc tgctgaaggc cctgcggaac ccgtgcaga ggcgtcgat 840  
gaggccgagc ggcgcgcccg tggctgccac ctgcagacc agcgggcccg tgtgcgttc 900  
ctgccccct tcgaggcca cccgttgac ggcggccgcc gcctcacga cctgcttggc 960  
cccactggc tgctagacgt gtccaccctc gtggcgccac acgcccgtg gctggactcg 1020  
cgtgtagcct ctctggaggg tggcgtgtc gtggtgggc gggagcccgg tgtcacctcc 1080  
attgaggtgc gtccccact gtctgactcc atcctggggg agcaggcgct ggctgtgacg 1140  
gacgacaagg tctcagtgt ggagctgagg gtgcagccag tgatgggcat ctgctgacc 1200  
ttgagccggg gactgcca cccgggggag gtcacagcta cgtgctgggc acagtcagcc 1260  
cttccgccc caaagcagga ggtggccctc tccctatggc tgtcttctc tgatcacact 1320  
gtggccccag ctgagctcta cgaccgccgt gacctgggac tgtccgtctc agccgaggag 1380  
cctggtgcca tctgcccagc tgaggagcag ggtgcccagc tcggggtgtt ggtgagtggt 1440  
gcaggcgccg aggggtgcc gctgcatgtg gctctgcacc cgccgagcc ctgccgccg 1500  
ggccgccacc gtgtgcctct ggcctctggc accgctggc tggggtgcc cctgccctcc 1560  
actccagccc ctgctctccc atccagccct gcttgagacc caccagccac agaagccacc 1620



atgggtggta aacggcaggt ggcaggcagt gtcgggggca acacaggigt gaggggcaag 1680  
tttagcggg cagaggagga ggccaggaag gaggagaccg aagccaggga cggaggagga 1740  
ggaagaggag gaggagatgg tccctgcccc tcagcatgtc ac 1782

<210> 9

<211> 2735

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

attgtctggg aattgcagcc gcggggcggg cggcggcggc ggccggcggc gccgggaccc 60  
agcggggccag gtggggacgg cgcggagcgg gtgcgggaga tgccgtgcgg gactggggcc 120  
acctgagccg cccgcctcgt ccccgccctc tgtgggaagg atgtgcgcgc ggatggccgg 180  
tcgcacaaca gcggccctc gggggcccta cggcccttgg ctctgcctcc tggtagccct 240  
cgccctggac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc ctggaccctg ggctgcatgt 300  
gacagccgcc cgcccagccc agcccacact ctggactgcc aagctggacc gcttcaaggg 360  
ctccaggcac cacaccacc tcatcacctg ccaccgtgct gggctcacag agccagattc 420  
cagcagtcct ctigaactgt ctgagttcct atgggtggac ttgtgtgtgg agaatagcac 480  
tggtagggggc gtagcgggtc ctgcctccgt cactgtggcag ctggagtacc caggccaggc 540  
ccctgaagca gagaaggaca aaatgggtgt ggaaatcctg gtgtctgagc gggacatcag 600  
agcccttata ccactggcca aggctgagga gctgggtgat acagcaccac tgactggagt 660  
gccccagcat gtccccgtgc gccttgtcac tgtggacggc gggggggcct tggtaggagt 720  
gacagagcat gtcggctgcg agtctgcca cacacaggtc ctgcaggigt ctgaggcctg 780  
tgatgccgtg ttctgtggctg gcaaggagag ccggggcgcc cgggggggtgc gactggactt 840  
ctggtaggcgc cggctccgcg cctcgtgcg gctgaccgtg tgggcccccc tgctaccgct 900  
gcgtatcgag ctaccgaca ccacctcga gcaggctcgc ggctggaggg tacctggccc 960  
tgctgaaggc cctgcggaac ccgtgcaga ggcgtcggat gaggccgagc ggcgcgcccc 1020  
tggtgccac ctgcagtacc agcgggcccg tgtgcgttc ctgccccct tcgcggccca 1080  
cccgtggac ggcggccgcc gcctcacgca cctgcttggc cccgactggc tgctagacgt 1140  
gtcccaccic gtggcgccac acgcccgcgt gctggactcg cgtgtagcct ctctggaggg 1200

tggccgtgtc gtggtgggcc gggagcccgg tgtcacctcc attgaggtgc gttccccact 1260  
gtctgactcc atcctggggg agcaggcgct ggctgtgacg gacgacaagg tctcagtgt 1320  
ggagctgagg gtgcagccag tgatgggcat ctgcctgacc ttgagccggg gcactgcccc 1380  
ccccggggag gtcacagcta cgtgctgggc acagtcagcc cttcccgccc caaagcagga 1440  
ggtggccctc tccctatggc tgtccttctc tgatcacact gtggccccag ctgagctcta 1500  
cgaccgccgt gacctgggac tgtccgtctc agccgaggag cctgggtgcca tcttgccagc 1560  
tgaggagcag ggigcccagc tcgggggtgt ggtgagtggg gcaggcgccg aggggctgcc 1620  
gctgcatgtg gctctgcacc cgcccagacc ctgccgccgg ggccgccacc gtgtgccctc 1680  
ggcctctggc accgcctggc tggggctgcc ccttgccctc actccagccc ctgctctccc 1740  
atccagccct gcttggagcc caccagccac agaagccacc atgggtggta aacggcaggt 1800  
ggcaggcagt gtcgggggca acacaggtgt gaggggcaag tttagcgggg cagaggagga 1860  
ggccaggaag gaggagaccg aagccagga cggaggagga ggaagaggag gaggagatgg 1920  
tccctgcccc tcagcatgtc actgagctag agctgggcat gtacgccctg ctgggagtct 1980  
tctgcgtggc catcttcac tcttgggtca atgggtgtgt cticgtcctg cgctatcagc 2040  
gcaaagaacc tccgacagt gccactgacc ccacctcccc ccagccccac aactgggtct 2100  
ggctgggcac tgaccaggag gaactgagcc gccagctgga ccggcagtc cctggccccg 2160  
ccaaggggga ggggagctgc cctgtgaga gtgggggagg aggggaggcc cctaccctgg 2220  
ccccggccc tcttgggggc accaccagct cctcaagcac cctggcccga aaggaggctg 2280  
gggggcgggc gaagcgagta gagtttgtga catttgcgc agccctcca gccagtcac 2340  
ctgaggagcc tgtaggggcc cctgctgtgc agtccatcct tgtggcaggc gaggaggaca 2400  
tccgttgggt gtgtaggac atggggctga aggaccctga ggagcttcgc aactacatgg 2460  
agaggatccg gggcagctcc tgacctcca cagccacctg gtcagccacc agctggggca 2520  
acgagggtgg aggtccact gagcctctcg cctgccccg ccactcgtct ggtgcttgtt 2580  
gatccaagtc cctgcctgg tccccacaa ggactccat ccaggcccc tctgcccctg 2640  
cccttgtcat ggacatggt cgtgaggaag ggctcatgcc cttatttat gggaaccatt 2700  
tcattctaac agaataaacc gagaaggaaa ccaga 2735

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 639

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 10

Met Val Trp Glu Ile Leu Val Ser Glu Arg Asp Ile Arg Ala Leu Ile

5 10 15

Pro Leu Ala Lys Ala Glu Glu Leu Val Asn Thr Ala Pro Leu Thr Gly

20 25 30

Val Pro Gln His Val Pro Val Arg Leu Val Thr Val Asp Gly Gly Gly

35 40 45

Ala Leu Val Glu Val Thr Glu His Val Gly Cys Glu Ser Ala Asn Thr

50 55 60

Gln Val Leu Gln Val Ser Glu Ala Cys Asp Ala Val Phe Val Ala Gly

65 70 75 80

Lys Glu Ser Arg Gly Ala Arg Gly Val Arg Val Asp Phe Trp Trp Arg

85 90 95

Arg Leu Arg Ala Ser Leu Arg Leu Thr Val Trp Ala Pro Leu Leu Pro

100 105 110

Leu Arg Ile Glu Leu Thr Asp Thr Thr Leu Glu Gln Val Arg Gly Trp

115 120 125

Arg Val Pro Gly Pro Ala Glu Gly Pro Ala Glu Pro Ala Ala Glu Ala

130 135 140

Ser Asp Glu Ala Glu Arg Arg Ala Arg Gly Cys His Leu Gln Tyr Gln

145 150 155 160

Arg Ala Gly Val Arg Phe Leu Ala Pro Phe Ala Ala His Pro Leu Asp

165 170 175

Gly Gly Arg Arg Leu Thr His Leu Leu Gly Pro Asp Trp Leu Leu Asp

180 185 190

Val Ser His Leu Val Ala Pro His Ala Arg Val Leu Asp Ser Arg Val

195 200 205

23/78

Ala Ser Leu Glu Gly Gly Arg Val Val Val Gly Arg Glu Pro Gly Val  
210 215 220

Thr Ser Ile Glu Val Arg Ser Pro Leu Ser Asp Ser Ile Leu Gly Glu  
225 230 235 240

Gln Ala Leu Ala Val Thr Asp Asp Lys Val Ser Val Leu Glu Leu Arg  
245 250 255

Val Gln Pro Val Met Gly Ile Ser Leu Thr Leu Ser Arg Gly Thr Ala  
260 265 270

His Pro Gly Glu Val Thr Ala Thr Cys Trp Ala Gln Ser Ala Leu Pro  
275 280 285

Ala Pro Lys Gln Glu Val Ala Leu Ser Leu Trp Leu Ser Phe Ser Asp  
290 295 300

His Thr Val Ala Pro Ala Glu Leu Tyr Asp Arg Arg Asp Leu Gly Leu  
305 310 315 320

Ser Val Ser Ala Glu Glu Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ala Glu Glu Gln  
325 330 335

Gly Ala Gln Leu Gly Val Val Val Ser Gly Ala Gly Ala Glu Gly Leu  
340 345 350

Pro Leu His Val Ala Leu His Pro Pro Glu Pro Cys Arg Arg Gly Arg  
355 360 365

His Arg Val Pro Leu Ala Ser Gly Thr Ala Trp Leu Gly Leu Pro Pro  
370 375 380

Ala Ser Thr Pro Ala Pro Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Trp Ser Pro  
385 390 395 400

Pro Ala Thr Glu Ala Thr Met Gly Gly Lys Arg Gln Val Ala Gly Ser  
405 410 415

Val Gly Gly Asn Thr Gly Val Arg Gly Lys Phe Glu Arg Ala Glu Glu  
420 425 430

Glu Ala Arg Lys Glu Glu Thr Lys Ala Arg Glu Glu Glu Glu Glu

435 440 445  
Glu Glu Glu Met Val Pro Ala Pro Gln His Val Thr Glu Leu Glu Leu  
450 455 460  
Gly Met Tyr Ala Leu Leu Gly Val Phe Cys Val Ala Ile Phe Ile Phe  
465 470 475 480  
Leu Val Asn Gly Val Val Phe Val Leu Arg Tyr Gln Arg Lys Glu Pro  
485 490 495  
Pro Asp Ser Ala Thr Asp Pro Thr Ser Pro Gln Pro His Asn Trp Val  
500 505 510  
Trp Leu Gly Thr Asp Gln Glu Glu Leu Ser Arg Gln Leu Asp Arg Gln  
515 520 525  
Ser Pro Gly Pro Pro Lys Gly Glu Gly Ser Cys Pro Cys Glu Ser Gly  
530 535 540  
Gly Gly Gly Glu Ala Pro Thr Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gly Gly Thr  
545 550 555 560  
Thr Ser Ser Ser Ser Thr Leu Ala Arg Lys Glu Ala Gly Gly Arg Arg  
565 570 575  
Lys Arg Val Glu Phe Val Thr Phe Ala Pro Ala Pro Pro Ala Gln Ser  
580 585 590  
Pro Glu Glu Pro Val Gly Ala Pro Ala Val Gln Ser Ile Leu Val Ala  
595 600 605  
Gly Glu Glu Asp Ile Arg Trp Val Cys Glu Asp Met Gly Leu Lys Asp  
610 615 620  
Pro Glu Glu Leu Arg Asn Tyr Met Glu Arg Ile Arg Gly Ser Ser  
625 630 635

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1917

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 11

atggtgtggg aaatccctggt gcttgagcgg gacatcagag cccattatccc actggccaag 60  
gctgaggagc tggatgaatac agcaccacitg actggagtgc cccagcatgt ccccgctgcgc 120  
cttgtcactg tggacggcgg gggggccctg gtggaggatga cagagcatgt cggctgcgag 180  
tctgccaaca cacaggctcct gcagggtgtct gaggcctgtg atgccgtgtt cgtggctggc 240  
aaggagagcc ggggcgcccc gggggtgcga gtggacttct ggtggcgccg gctccgcgcc 300  
tcgctgcggc tgaccgtgtg ggccccctg ctaccgtgc gtatcgagct caccgacacc 360  
accctcgagc aggtccgcgg ctggagggtta cctggccctg ctgaagggcc tgcggaacct 420  
gctgcagagg cgtcggtatga ggccgagcgg cgcgcccgtg gctgccacct gcagtaccag 480  
cgggccggtg tgcgtttcct cgccccctc ggggccacc cgctggacgg cggccgcgc 540  
ctcacgcacc tgcttggccc cgactggctg ctagacgtgt cccacctgt ggccgcacac 600  
gcccgcgtgc tggactcgcg ttagcctct ctggagggtg gccgtgtcgt ggtgggccgg 660  
gagccccgtg tcacctccat tgagggtcgt tccccactgt ctgactccat cctgggggag 720  
caggcgctgg ctgtgacgga cgacaaggct tcagtgtctg agctgagggt gcagccagt 780  
atgggcatct cgctgacctt gagccggggc actgcccacc ccggggagggt cacagctacg 840  
tgctgggcac agtcagccct tcccgccca aagcaggagg tggccctctc cctatggctg 900  
tccttctctg atcacacigt ggccccagct gaggctctac accgccgtga cctgggactg 960  
tccgtctcag ccgaggagcc tggtgccatc ctgccagctg aggagcaggg tgcccagctc 1020  
ggggtgtgtg tgagtggggc aggcgccgag gggctgccgc tgcatgtggc tctgcacccg 1080  
cccgagccct gccgccgggg ccgccaccgt gtgccctctg cctctggcac cgcctggctg 1140  
gggctgcccc ctgccctccac tccagccct gctctcccat ccagccctgc ttggagccca 1200  
ccagccacag aagccaccat ggggtggtaaa cggcagggtg caggcagtgt cgggggcaac 1260  
acagggtgtga ggggcaagtt tgagcgggca gaggaggagg ccaggaagga ggagacaaaa 1320  
gccaggaggagg aggaggagga agaggaggag gagatgggtc ctgccccctc gcatgtcact 1380  
gagctagagc tgggcatgia cgccctgctg ggagtcttct gcgtggccat ctcatcttc 1440  
ttggticaatg gtgtgtgtctt cgtcctgcgc tatcagcgca aagaacctcc cgacagtgcc 1500  
actgacccca cctcccccca gcccacaaac tgggtctggc tgggcactga ccaggaggaa 1560  
ctgagccgcc agctggaccg gcagtcacct ggccgcccc aaggggaggagg gagctgcccc 1620

tgtgagagtg ggggaggagg ggaggcccc accctggccc ctggccctcc tgggggcacc 1680  
accagctcct caagcacctt ggcccgaag gaggtgggg ggcggcggaa gcgagtagag 1740  
tttgtacat ttgcgccagc cctccagcc cagtcacctg aggagcctgt aggggcccc 1800  
gctgtgcagt ccatccttgt ggcaggcgag gaggacatcc gctgggtgtg tgaggacatg 1860  
gggcigaagg accctgagga gcttcgcaac tacaiggaga ggatccgggg cagctcc 1917

<210> 12

<211> 2235

<212> DNA

<213> Human

<400> 12

cactcgcccc gtcacgtggc agctggagta cccaggccag gcccctgaag cagagaagga 60  
caaaatgggtg tgggaaatcc tgggtgtctga gcgggacatc agagccctta tcccactggc 120  
caaggctgag gagctgggtga atacagcacc actgactgga gtgccccagc atgtccccgt 180  
gcgccitgtc actgtggacg gcggggggggc cttgggtggag gtgacagagc atgtcggctg 240  
cgagtctgcc aacacacagg tcctgcaggt gtcgaggcc tgtgatgccg tgttcgtggc 300  
tggcaaggag agccggggcg cccggggggt gcgagtggac ttctgggtggc gccggctccg 360  
cgcttcgctg cggtcgaccg tgtgggcccc cctgctaccg ctgcgtatcg agctcaccga 420  
caccaccctc gagcaggtec gcggctggag ggtacctggc cctgctgaag ggcttcggga 480  
accgctgca gaggcgtcgg atgaggccga gcggcgcgcc cgtggctgcc acctgcagta 540  
ccagcggggc ggtgtgcgtt tcctgcccc cttcgggcc caccgctgg acggcggccg 600  
ccgcttcacg caccitgtt gccccactg gctgctagac gtgtccacc tcgtggcgcc 660  
acacgcccgc gtgctggact cgcgtgtagc ctctctggag ggtggccgtg tcgtggtggg 720  
ccgggagccc ggtgtcacct ccattgaggt gcgttcccca ctgtctgact ccatcctggg 780  
ggagcaggcg ctggctgtga cggacgaaa ggtctcagtg ctggagctga ggggtcagcc 840  
agtgatgggc atctcgctga ccttagaccg gggcactgcc caccgcggg aggtcacagc 900  
tacgtgctgg gcacagtcag ccttccgc cccaaagcag gaggtggccc tctccctatg 960  
gctgtccttc tcgatcaca ctgtggcccc agctgagctc tacgaccgcc gtgacctggg 1020  
actgtccgtc tcagccgagg agcctgggtc catcctgcca gctgaggagc agggtgccca 1080

27/78

gctcggggtg gttgtgagt gggcaggcgc cgaggggctg ccgctgcatg tggctctgca 1140  
 cccgcccag ccttgcgcg ggggcccga cctgtgtcct ctggcctctg gcaccgcctg 1200  
 gctggggctg cccctgcct ccactccagc cctgtctctc ccatccagcc ctgcttggag 1260  
 cccaccagcc acagaagcca ccatgggttg taaacggcag gtggcaggca gtgtcggggg 1320  
 caacacaggt gtgaggggca agtttgagcg ggcagaggag gaggccagga aggaggagac 1380  
 caaagccagg gaggaggagg aggaagagga ggaggagatg gtccctgccc ctacagcatgt 1440  
 cactgagcta gagctgggca tgtacgccct gctgggagtc ttctgcgttg ccatcttcat 1500  
 ctcttgggtc aatgggtgtg tcttcgtcct gcgtatcag cgcaaagaac ctcccagacag 1560  
 tgccactgac ccacctccc ccagcccca caactgggtc tggctgggca ctgaccagga 1620  
 ggaactgagc cgccagctgg accggcagtc ccttggcccg cccaaggggg aggggagctg 1680  
 cccctgtgag agtgggggag gaggggaggc ccctaccctg gcccctggcc ctcttggggg 1740  
 caccaccagc tcctcaagca ccttggcccg aaaggaggct ggggggcggc ggaagcgagt 1800  
 agagtttgtg acatttgcgc cagccctccc agcccagtca cctgaggagc ctgtaggggc 1860  
 cctgtctgtg cagtcctacc ttgtggcagg cgaggaggac atccgctggg tgtgtgagga 1920  
 catggggctg aaggacctg aggagcttcg caactacatg gagaggatcc ggggcagctc 1980  
 ctgacctcc acagccacct ggtcagccac cagctggggc aacgagggtg gaggtccac 2040  
 tgagcctctc gcctgcccc gccactcgtc tggctgtgtg tgatccaagt cccctgacctg 2100  
 gtccccaca aggactccca tccaggcccc ctctgcctg ccccttgtca tggaccatgg 2160  
 tcgtgaggaa gggctcatgc ccttattta tgggaacat ttcattctaa cagaataaac 2220  
 cgagaaggaa accag 2235

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide

&lt;400&gt; 13

agaccacacc attgaccaag

20



<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide

<400> 14

gaaccagtta ccacaccaga

20

<210> 15

<211> 1024

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Met Cys Ala Arg Met Ala Gly Arg Thr Thr Ala Ala Pro Arg Gly Pro

5

10

15

Tyr Gly Pro Trp Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Asp Val Val

20

25

30

Arg Val Asp Cys Gly Gln Ala Pro Leu Asp Pro Val Tyr Leu Pro Ala

35

40

45

Ala Leu Glu Leu Leu Asp Ala Pro Glu His Phe Arg Val Gln Gln Val

50

55

60

Gly His Tyr Pro Pro Ala Asn Ser Ser Leu Ser Ser Arg Ser Glu Thr

65

70

75

80

Phe Leu Leu Leu Gln Pro Trp Pro Arg Ala Gln Pro Leu Leu Arg Ala

85

90

95

Ser Tyr Pro Pro Phe Ala Thr Gln Gln Val Val Pro Pro Arg Val Thr

100

105

110

Glu Pro His Gln Arg Pro Val Pro Trp Asp Val Arg Ala Val Ser Val  
115 120 125

Glu Ala Ala Val Thr Pro Ala Glu Pro Tyr Ala Arg Val Leu Phe His  
130 135 140

Leu Lys Gly Gln Asp Trp Pro Pro Gly Ser Gly Ser Leu Pro Cys Ala  
145 150 155 160

Arg Leu His Ala Thr His Pro Ala Gly Thr Ala His Gln Ala Cys Arg  
165 170 175

Phe Gln Pro Ser Leu Gly Ala Cys Val Val Glu Leu Glu Leu Pro Ser  
180 185 190

His Trp Phe Ser Gln Ala Ser Thr Thr Arg Ala Glu Leu Ala Tyr Thr  
195 200 205

Leu Glu Pro Ala Ala Glu Gly Pro Gly Gly Cys Gly Ser Gly Glu Glu  
210 215 220

Asn Asp Pro Gly Glu Gln Ala Leu Pro Val Gly Gly Val Glu Leu Arg  
225 230 235 240

Pro Ala Asp Pro Pro Gln Tyr Gln Glu Val Pro Leu Asp Glu Ala Val  
245 250 255

Thr Leu Arg Val Pro Asp Met Pro Val Arg Pro Gly Gln Leu Phe Ser  
260 265 270

Ala Thr Leu Leu Leu Arg His Asn Phe Thr Ala Ser Leu Leu Thr Leu  
275 280 285

Arg Ile Lys Val Lys Lys Gly Leu His Val Thr Ala Ala Arg Pro Ala  
290 295 300

Gln Pro Thr Leu Trp Thr Ala Lys Leu Asp Arg Phe Lys Gly Ser Arg  
305 310 315 320

His His Thr Thr Leu Ile Thr Cys His Arg Ala Gly Leu Thr Glu Pro  
325 330 335

Asp Ser Ser Ser Pro Leu Glu Leu Ser Glu Phe Leu Trp Val Asp Phe

340 345 350  
Val Val Glu Asn Ser Thr Gly Gly Gly Val Ala Val Thr Arg Pro Val  
355 360 365  
Thr Trp Gln Leu Glu Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Glu Ala Glu Lys Asp  
370 375 380  
Lys Met Val Trp Glu Ile Leu Val Ser Glu Arg Asp Ile Arg Ala Leu  
385 390 395 400  
Ile Pro Leu Ala Lys Ala Glu Glu Leu Val Asn Thr Ala Pro Leu Thr  
405 410 415  
Gly Val Pro Gln His Val Pro Val Arg Leu Val Thr Val Asp Gly Gly  
420 425 430  
Gly Ala Leu Val Glu Val Thr Glu His Val Gly Cys Glu Ser Ala Asn  
435 440 445  
Thr Gln Val Leu Gln Val Ser Glu Ala Cys Asp Ala Val Phe Val Ala  
450 455 460  
Gly Lys Glu Ser Arg Gly Ala Arg Gly Val Arg Val Asp Phe Trp Trp  
465 470 475 480  
Arg Arg Leu Arg Ala Ser Leu Arg Leu Thr Val Trp Ala Pro Leu Leu  
485 490 495  
Pro Leu Arg Ile Glu Leu Thr Asp Thr Thr Leu Glu Gln Val Arg Gly  
500 505 510  
Trp Arg Val Pro Gly Pro Ala Glu Gly Pro Ala Glu Pro Ala Ala Glu  
515 520 525  
Ala Ser Asp Glu Ala Glu Arg Arg Ala Arg Gly Cys His Leu Gln Tyr  
530 535 540  
Gln Arg Ala Gly Val Arg Phe Leu Ala Pro Phe Ala Ala His Pro Leu  
545 550 555 560  
Asp Gly Gly Arg Arg Leu Thr His Leu Leu Gly Pro Asp Trp Leu Leu  
565 570 575

Asp Val Ser His Leu Val Ala Pro His Ala Arg Val Leu Asp Ser Arg  
580 585 590

Val Ala Ser Leu Glu Gly Gly Arg Val Val Val Gly Arg Glu Pro Gly  
595 600 605

Val Thr Ser Ile Glu Val Arg Ser Pro Leu Ser Asp Ser Ile Leu Gly  
610 615 620

Glu Gln Ala Leu Ala Val Thr Asp Asp Lys Val Ser Val Leu Glu Leu  
625 630 635 640

Arg Val Gln Pro Val Met Gly Ile Ser Leu Thr Leu Ser Arg Gly Thr  
645 650 655

Ala His Pro Gly Glu Val Thr Ala Thr Cys Trp Ala Gln Ser Ala Leu  
660 665 670

Pro Ala Pro Lys Gln Glu Val Ala Leu Ser Leu Trp Leu Ser Phe Ser  
675 680 685

Asp His Thr Val Ala Pro Ala Glu Leu Tyr Asp Arg Arg Asp Leu Gly  
690 695 700

Leu Ser Val Ser Ala Glu Glu Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ala Glu Glu  
705 710 715 720

Gln Gly Ala Gln Leu Gly Val Val Val Ser Gly Ala Gly Ala Glu Gly  
725 730 735

Leu Pro Leu His Val Ala Leu His Pro Pro Glu Pro Cys Arg Arg Gly  
740 745 750

Arg His Arg Val Pro Leu Ala Ser Gly Thr Ala Trp Leu Gly Leu Pro  
755 760 765

Pro Ala Ser Thr Pro Ala Pro Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Trp Ser  
770 775 780

Pro Pro Ala Thr Glu Ala Thr Met Gly Gly Lys Arg Gln Val Ala Gly  
785 790 795 800

Ser Val Gly Gly Asn Thr Gly Val Arg Gly Lys Phe Glu Arg Ala Glu

805	810	815
Glu Glu Ala Arg Lys Glu Glu Thr Glu Ala Arg Glu Glu Glu Glu Glu		
820	825	830
Glu Glu Glu Glu Met Val Pro Ala Pro Gln His Val Thr Glu Leu Glu		
835	840	845
Leu Gly Met Tyr Ala Leu Leu Gly Val Phe Cys Val Ala Ile Phe Ile		
850	855	860
Phe Leu Val Asn Gly Val Val Phe Val Leu Arg Tyr Gln Arg Lys Glu		
865	870	875
Pro Pro Asp Ser Ala Thr Asp Pro Thr Ser Pro Gln Pro His Asn Trp		
885	890	895
Val Trp Leu Gly Thr Asp Gln Glu Glu Leu Ser Arg Gln Leu Asp Arg		
900	905	910
Gln Ser Pro Gly Pro Pro Lys Gly Glu Gly Ser Cys Pro Cys Glu Ser		
915	920	925
Gly Gly Gly Gly Glu Ala Pro Thr Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gly Gly		
930	935	940
Thr Thr Ser Ser Ser Ser Thr Leu Ala Arg Lys Glu Ala Gly Gly Arg		
945	950	955
Arg Lys Arg Val Glu Phe Val Thr Phe Val Pro Ala Pro Pro Ala Gln		
965	970	975
Ser Pro Glu Glu Pro Val Gly Ala Pro Ala Val Gln Ser Ile Leu Val		
980	985	990
Ala Gly Glu Glu Asp Ile Arg Trp Val Cys Glu Asp Met Gly Leu Lys		
995	1000	1005
Asp Pro Glu Glu Leu Arg Asn Tyr Met Glu Arg Ile Arg Gly Ser Ser		
1010	1015	1020

&lt;211&gt; 3072

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 16

aigtgcgcgc ggaatggccgg tcgcacaaca gcgggccctc gggggcccta cggcccttgg	60
ctctgccctc tggatggccct cgccctggac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc	120
ctggaccctg tctacctgcc ggcagccctg gagctcctag acgcccciga acacttccgt	180
gtgcagcagg tgggccaacta cccacctgcc aactcctctc tgagctcccg atctgagacc	240
tttctgctcc tacagccctg gccaggggcc cagccacttc tccgggcctc ctaccacct	300
tttgccactc agcagggtggc ccccccctga gtcactgagc cccaccaacg gccagtccca	360
tgggacgtgc gggccgtttc agtgggaagcg gctgtgactc cagcagagcc ctacgcccgg	420
gttctcttcc acctcaaagg gcaggattgg ccaccagggt ctggcagcct gccctgtgcc	480
cggctccatg ccacacaccc tgcaggcact gctaccaag cctgccgctt ccagccatcc	540
ctgggcgcct gcgtggttga gctggagctt cctctgcact ggttctcaca ggcttccacc	600
acacggggccg agctggccta cagccttgag cctgcagctg agggccctgg gggctgtggc	660
tccggcgagg agaacgaccc tggggagcag gccctcccag tgggggggtgt ggagctgcgc	720
ccagcagacc ccccgagta ccaggaggta cctctggacg aggcctgtgac tctgcgggtg	780
cctgacatgc cagtgcggcc cggccagctc tttagtgtta ccttctgtct tgggcacaac	840
ttcacagcca gcctcttgac cctgcggatc aaggtgaaga aggggctgca tgtgacagcc	900
gcccggccag cccagccac actctggact gccaaactag accgcttcaa gggctccagg	960
caccacacca cctctatcac ctgccaccgt gctgggctca cagagccaga ttccagcagt	1020
ccccitgaac tgtctgagtt cctatgggtg gactttgttg tggagaatag cactgggtgg	1080
ggcgtagcgg tcactcgcgc cgtcacgtgg cagctggagt acccaggcca ggccccigaa	1140
gcagagaagg acaaaatggt gtgggaaatc ctggtgtctg agcgggacat cagagccctt	1200
atcccactgg ccaaggctga ggagctggtg aatacagcac cactgactgg agtgcgccag	1260
catgtccccg tgcgccttgt cactgtggac ggcggggggg ccttgggtga ggtgacagag	1320
catgtcggct gcgagtctgc caacacacag gtcctgcagg tgtctgaggc ctgtgatgcc	1380
gtgttcgttg ctggcaagga gagccggggc gcccgggggg tgcgagtga cttctgggtg	1440
cgcgggtcc gcgcctcgt gcggtgacc gtgtgggccc cgctgctacc gctgcgtatc	1500

gagctcaccg acaccacct cgagcaggtc cgcggctgga gggtacctgg ccctgctgaa 1560  
gggcctgcgg aaccgcctgc agaggcgtca gatgaggccg agcggcgcgc ccgtggctgc 1620  
caccitgcagt accagcgggc cgggtgtgcgc ttctctgccc ctttcgcggc ccaccgcctg 1680  
gacggcggcc gccgccac gcacctgctt ggccccgact ggctgctaga cgtgtccac 1740  
ctcgtggcgc cacacgcccg cgtgctggac tgcgtgtag cctctctgga gggtggccgt 1800  
gtcgtgggtg gccgggagcc cgggtgtacc tccattgagg tgcgttccc actgtctgac 1860  
tccatcctgg gggagcaggc gctggctgtg acggacgaca aggtctcagt gctggagctg 1920  
aggggtcagc cagtgatggg catctcgtg accttgagcc ggggcactgc ccaccccg 1980  
gaggtcacag ctacgtgtg ggcacagtca gcccttccc ccccaaagca ggaggtggcc 2040  
ctctccctat ggctgtcctt ctctgatac actgtggccc cagctgagct ctacgaccgc 2100  
cgtgacctgg gactgtccgt ctacccgag gagcctgggt ccatcctgcc agctgaggag 2160  
caggggtccc agctcggggt ggtgggtgagt ggggcaggcg ccgaggggct gccgctgcat 2220  
gtggctctgc acccgcccga gccctgcgc cggggccgcc accgtgtgcc tctggcctct 2280  
ggcaccgctt ggctggggct gccccctgcc tccactccag cccctgctct cccatccagc 2340  
cctgcttgga gccaccagc cacagaagcc accatgggtg gtaaaccgca ggtggcaggc 2400  
agtgtcgggg gcaacacagg tgtgaggggc aagtttgagc gggcagagga ggaggccagg 2460  
aaggaggaga ccgaagccag ggaggaggag gaggaagagg aggaggagat ggtccctgcc 2520  
cctcagcatg tcatgagct agagctgggc atgtacgcc tgcctggagt cttctgcgtg 2580  
gccatcttca tcttcttggt caatgggtg gtcttcgtcc tgcgtatca gcgcaaagaa 2640  
cctcccgaca gtgccactga cccacctcc cccagcccc acaactgggt ctggctgggc 2700  
actgaccagg aggaactgag ccgccagctg gaccggcagt cccctggccc gccaagggg 2760  
gaggggagct gccccctgga gactggggga ggaggggagg cccctaccct ggccccctgc 2820  
cctcttgggg gcaccaccag ctctcaagc acctggccc gaaaggaggc tggggggcgg 2880  
cggaagcgag tagagtgtg gacatttgt ccagccccct cagcccagtc acctgaggag 2940  
cctgtagggg cccctgctgt gcagtccatc cttgtggcag gcgaggagga catccgctgg 3000  
gtgtgtgagg acatggggct gaaggacct gaggagcttc gcaactacat ggagaggatc 3060  
cggggcagct cc 3072

&lt;211&gt; 1020

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 17

Met Ala Gly Arg Thr Thr Ala Ala Pro Arg Gly Pro Tyr Gly Pro Trp

5 10 15

Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Asp Val Val Arg Val Asp Cys

20 25 30

Gly Gln Ala Pro Leu Asp Pro Val Tyr Leu Pro Ala Ala Leu Glu Leu

35 40 45

Leu Asp Ala Pro Glu His Phe Arg Val Gln Gln Val Gly His Tyr Pro

50 55 60

Pro Ala Asn Ser Ser Leu Ser Ser Arg Ser Glu Thr Phe Leu Leu Leu

65 70 75 80

Gln Pro Trp Pro Arg Ala Gln Pro Leu Leu Arg Ala Ser Tyr Pro Pro

85 90 95

Phe Ala Thr Gln Gln Val Val Pro Pro Arg Val Thr Glu Pro His Gln

100 105 110

Arg Pro Val Pro Trp Asp Val Arg Ala Val Ser Val Glu Ala Ala Val

115 120 125

Thr Pro Ala Glu Pro Tyr Ala Arg Val Leu Phe His Leu Lys Gly Gln

130 135 140

Asp Trp Pro Pro Gly Ser Gly Ser Leu Pro Cys Ala Arg Leu His Ala

145 150 155 160

Thr His Pro Ala Gly Thr Ala His Gln Ala Cys Arg Phe Gln Pro Ser

165 170 175

Leu Gly Ala Cys Val Val Glu Leu Glu Leu Pro Ser His Trp Phe Ser

180 185 190

Gln Ala Ser Thr Thr Arg Ala Glu Leu Ala Tyr Thr Leu Glu Pro Ala



195 200 205  
Ala Glu Gly Pro Gly Gly Cys Gly Ser Gly Glu Glu Asn Asp Pro Gly  
210 215 220  
Glu Gln Ala Leu Pro Val Gly Gly Val Glu Leu Arg Pro Ala Asp Pro  
225 230 235 240  
Pro Gln Tyr Gln Glu Val Pro Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Arg Val  
245 250 255  
Pro Asp Met Pro Val Arg Pro Gly Gln Leu Phe Ser Ala Thr Leu Leu  
260 265 270  
Leu Arg His Asn Phe Thr Ala Ser Leu Leu Thr Leu Arg Ile Lys Val  
275 280 285  
Lys Lys Gly Leu His Val Thr Ala Ala Arg Pro Ala Gln Pro Thr Leu  
290 295 300  
Trp Thr Ala Lys Leu Asp Arg Phe Lys Gly Ser Arg His His Thr Thr  
305 310 315 320  
Leu Ile Thr Cys His Arg Ala Gly Leu Thr Glu Pro Asp Ser Ser Ser  
325 330 335  
Pro Leu Glu Leu Ser Glu Phe Leu Trp Val Asp Phe Val Val Glu Asn  
340 345 350  
Ser Thr Gly Gly Gly Val Ala Val Thr Arg Pro Val Thr Trp Gln Leu  
355 360 365  
Glu Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Glu Ala Glu Lys Asp Lys Met Val Trp  
370 375 380  
Glu Ile Leu Val Ser Glu Arg Asp Ile Arg Ala Leu Ile Pro Leu Ala  
385 390 395 400  
Lys Ala Glu Glu Leu Val Asn Thr Ala Pro Leu Thr Gly Val Pro Gln  
405 410 415  
His Val Pro Val Arg Leu Val Thr Val Asp Gly Gly Gly Ala Leu Val  
420 425 430

37/78

Glu Val Thr Glu His Val Gly Cys Glu Ser Ala Asn Thr Gln Val Leu  
435 440 445

Gln Val Ser Glu Ala Cys Asp Ala Val Phe Val Ala Gly Lys Glu Ser  
450 455 460

Arg Gly Ala Arg Gly Val Arg Val Asp Phe Trp Trp Arg Arg Leu Arg  
465 470 475 480

Ala Ser Leu Arg Leu Thr Val Trp Ala Pro Leu Leu Pro Leu Arg Ile  
485 490 495

Glu Leu Thr Asp Thr Thr Leu Glu Gln Val Arg Gly Trp Arg Val Pro  
500 505 510

Gly Pro Ala Glu Gly Pro Ala Glu Pro Ala Ala Glu Ala Ser Asp Glu  
515 520 525

Ala Glu Arg Arg Ala Arg Gly Cys His Leu Gln Tyr Gln Arg Ala Gly  
530 535 540

Val Arg Phe Leu Ala Pro Phe Ala Ala His Pro Leu Asp Gly Gly Arg  
545 550 555 560

Arg Leu Thr His Leu Leu Gly Pro Asp Trp Leu Leu Asp Val Ser His  
565 570 575

Leu Val Ala Pro His Ala Arg Val Leu Asp Ser Arg Val Ala Ser Leu  
580 585 590

Glu Gly Gly Arg Val Val Val Gly Arg Glu Pro Gly Val Thr Ser Ile  
595 600 605

Glu Val Arg Ser Pro Leu Ser Asp Ser Ile Leu Gly Glu Gln Ala Leu  
610 615 620

Ala Val Thr Asp Asp Lys Val Ser Val Leu Glu Leu Arg Val Gln Pro  
625 630 635 640

Val Met Gly Ile Ser Leu Thr Leu Ser Arg Gly Thr Ala His Pro Gly  
645 650 655

Glu Val Thr Ala Thr Cys Trp Ala Gln Ser Ala Leu Pro Ala Pro Lys

660 665 670  
Gln Glu Val Ala Leu Ser Leu Trp Leu Ser Phe Ser Asp His Thr Val  
675 680 685  
Ala Pro Ala Glu Leu Tyr Asp Arg Arg Asp Leu Gly Leu Ser Val Ser  
690 695 700  
Ala Glu Glu Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ala Glu Glu Gln Gly Ala Gln  
705 710 715 720  
Leu Gly Val Val Val Ser Gly Ala Gly Ala Glu Gly Leu Pro Leu His  
725 730 735  
Val Ala Leu His Pro Pro Glu Pro Cys Arg Arg Gly Arg His Arg Val  
740 745 750  
Pro Leu Ala Ser Gly Thr Ala Trp Leu Gly Leu Pro Pro Ala Ser Thr  
755 760 765  
Pro Ala Pro Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Trp Ser Pro Pro Ala Thr  
770 775 780  
Glu Ala Thr Met Gly Gly Lys Arg Gln Val Ala Gly Ser Val Gly Gly  
785 790 795 800  
Asn Thr Gly Val Arg Gly Lys Phe Glu Arg Ala Glu Glu Glu Ala Arg  
805 810 815  
Lys Glu Glu Thr Glu Ala Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
820 825 830  
Met Val Pro Ala Pro Gln His Val Thr Glu Leu Glu Leu Gly Met Tyr  
835 840 845  
Ala Leu Leu Gly Val Phe Cys Val Ala Ile Phe Ile Phe Leu Val Asn  
850 855 860  
Gly Val Val Phe Val Leu Arg Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Pro Asp Ser  
865 870 875 880  
Ala Thr Asp Pro Thr Ser Pro Gln Pro His Asn Trp Val Trp Leu Gly  
885 890 895

Thr Asp Gln Glu Glu Leu Ser Arg Gln Leu Asp Arg Gln Ser Pro Gly

900

905

910

Pro Pro Lys Gly Glu Gly Ser Cys Pro Cys Glu Ser Gly Gly Gly Gly

915

920

925

Glu Ala Pro Thr Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gly Gly Thr Thr Ser Ser

930

935

940

Ser Ser Thr Leu Ala Arg Lys Glu Ala Gly Gly Arg Arg Lys Arg Val

945

950

955

960

Glu Phe Val Thr Phe Val Pro Ala Pro Pro Ala Gln Ser Pro Glu Glu

965

970

975

Pro Val Gly Ala Pro Ala Val Gln Ser Ile Leu Val Ala Gly Glu Glu

980

985

990

Asp Ile Arg Trp Val Cys Glu Asp Met Gly Leu Lys Asp Pro Glu Glu

995

1000

1005

Leu Arg Asn Tyr Met Glu Arg Ile Arg Gly Ser Ser

1010

1015

1020

<210> 18

<211> 3060

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

```

atggccggtc gcacaacagc ggccccctcgg gggccctacg gcccctggct ctcctcctg    60
gtggccctcg ccttggaagt cgtgagagtg gactgtggcc aggctcccct ggaccctgtc    120
tacctgccgg cagccctgga gctcctagac gccctgaac acttccgtgt gcagcaggtg    180
ggccactacc cacctgcca ctcctctctg agctcccgat ctgagacctt tctgctccta    240
cagccctggc ccagggccca gccacttctc cgggcctcct acccaccitt tgccactcag    300
cagggtggcc cccctcgagt cactgagccc caccaacggc cagtcccatg ggacgtgcgg    360
gccgtttcag tggaagcggc tctgactcca gcagagccct acgcccgggt tctcttccac    420

```

ctcaaagggc aggatitggcc accaggggtct ggcagcctgc cctgtgcccgc gctccatgcc 480  
acacaccctg caggcactgc tcaccaagcc tgccgcttcc agccatccct gggcgccctgc 540  
giggiggagc tggagcttcc ctgcactgg ttctcacagg cctccaccac acgggccgag 600  
ctggcctaca cgcttgagcc tgcagctgag ggccctgggg gctgtggctc cggcgaggag 660  
aacgaccctg gggagcaggc cctcccagtg ggggggtgtg agctgcgccc agcagacccc 720  
ccgcagtacc aggaggtacc tctggacgag gctgtgactc tgcgggtgcc tgacatgcca 780  
gtcggccccg gccagctctt tagtgctacc ctctgcttc ggcacaactt cacagccagc 840  
ctcctgacct tgcggatcaa ggtgaagaag gggctgcatg tgacagccgc ccgcccagcc 900  
cagcccacac tctggactgc caagctagac cgcttcaagg gctccaggca ccacaccacc 960  
ctcatcacct gccaccgtgc tgggctcaca gagccagatt ccagcagtc ccttgaactg 1020  
tctgagttcc tatgggtgga ctttgtgtg gagaatagca ctggtggggg cgtagcggtc 1080  
actcggccccg tcacgtggca gctggagtac ccaggccagg cccctgaagc agagaaggac 1140  
aaaatggtgt gggaaatcct ggtgtctgag cgggacatca gagcccttat cccactggcc 1200  
aaggctgagg agctggtgaa tacagcacca ctgactggag tgccccagca tgtccccgtg 1260  
cgccctgtca ctgtggacgg cgggggggccc ttggtggagg tgacagagca tgtcggctgc 1320  
gagtctgcca acacacaggt cctgcagggt tctgaggcct gtgatgccgt gtctgtggct 1380  
ggcaaggaga gccgggggcgc ccgggggggtg cgagtggact tctggtggcg ccggctccgc 1440  
gcctcgctgc ggctgaccgt gtgggccccg ctgctaccgc tgcgtatcga gctaccgac 1500  
accaccctcg agcaggctccg cggctggagg gtacctggcc ctgctgaagg gcctgcggaa 1560  
cccgtcagc aggcgtcaga tgaggccgag cggcgcgccc gtggctgcca cctgcagtac 1620  
cagcggggccg gtgtgcgctt cctcgcccc ttgcggccc acccgctgga cggcgggcgc 1680  
cgccctacgc acctgcttgg cccgactgg ctgctagacg tgtcccacct cgtggcgcca 1740  
cacgcccgcg tgcctggactc gcgtgtagcc tctctggagg gtggccgtgt cgtggtgggc 1800  
cgggagccccg gtgtcacctc cattgagggt cgttccccac tgtctgactc catcctgggg 1860  
gagcaggcgc tggctgtgac ggacgacaag gtctcagtgc tggagctgag ggtgcagcca 1920  
glgatgggca tctcgctgac cttgagccgg ggcactgccc accccgggga ggtcacagct 1980  
acgtgctggg cacagtcage ccttcccgcc ccaaagcagg aggtggccct ctccctatgg 2040  
ctgtccttct ctgatcacac tgtggcccca gctgagctct acgaccgccc tgacctggga 2100  
ctgtccgtct cagccgagga gcctgggtgcc atcctgccag ctgaggagca ggggtgccag 2160

ctcggggtgg tggtagtg ggcaggcgcc gaggggctgc cgctgcatgt ggctctgcac 2220  
ccgcccagac cctgccgccc gggccgccac cgtgtgcctc tggcctctgg caccgcctgg 2280  
ctggggctgc cccctgcctc cactccagcc cctgtctctc catccagccc tgcctggagc 2340  
ccaccagcca cagaagccac catgggtggt aaacggcagg tggcaggcag tgtcgggggc 2400  
aacacaggtg tgaggggcaa gtttagcgg gcagaggagg aggccaggaa ggaggagacc 2460  
gaagccaggg aggaggagga ggaagaggag gaggagatgg tccctgcccc tcagcatgtc 2520  
actgagctag agctgggcat gtacgccctg ctgggagict tctgcgtggc catcttcac 2580  
ttcttggica atgggtggt cttcgtcctg cgctatcagc gcaaagaacc tcccgacagt 2640  
gccactgacc ccacctcccc ccagccccac aactgggtct ggctgggcac tgaccaggag 2700  
gaactgagcc gccagctgga ccggcagtc cctggccccg ccaaggggga ggggagctgc 2760  
cccgtgaga gtgggggagg aggggaggcc cctaccctgg cccctggccc tcctgggggc 2820  
accaccagct cctcaagcac cctggccga aaggaggctg gggggcggcg gaagcgagta 2880  
gagtttga catttgtcc agcccccca gccagtcac ctgaggagcc ttagggggcc 2940  
cctgctgtgc agtccatcct tgtggcaggc gaggaggaca tccgtgggt gtgtgaggac 3000  
atggggctga aggacctga ggagcttcgc aactacatgg agaggatccg gggcagctcc 3060

<210> 19

<211> 3505

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

attgtctggg aattgcagcc gcggggcggg cggcggcggc ggcggcggcg gccgggaccc 60  
agcgggccag gtggggacgg cgcggagcgg gtgcgggaga tgccgtgcgg gactggggcc 120  
acctgagccg cccgcctcgt ccccgccctc tgtgggaagg atgtgcgcgc ggatggccgg 180  
tcgcacaaca gcggccccctc gggggcccta cggccccctg ctctgcctcc tggtagccct 240  
cgccctggac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc ctggaccttg tctacctgcc 300  
ggcagccctg gagctcctag acgccccga acattccgt gtgcagcagg tgggccacta 360  
cccacctgcc aactcctctc tgagctcccg atctgagacc ttctgtctcc tacagccctg 420  
gcccagggcc cagccacttc tccgggcctc ctaccacct tttagccact agcagggtgt 480

ccccctcga gtcactgagc cccaccaacg gccagtccea tgggacgtgc gggccgttgc 540  
agtgggaagcg gctgtgactc cagcagagcc ctacgcccg gttctcttcc acctcaaagg 600  
gcaggatigg ccaccagggt ctggcagcct gccctgtgcc cggctccatg ccacacaccc 660  
tgcaggcact gtcaccaag cctgccgctt ccagccatcc ctgggcgcct gcgtgggtga 720  
gctggagctt cctcgcact gttctcaca ggctccacc acacgggccc agctggccta 780  
cacgttgag cctgcagctg agggccctgg gggctgtggc tccggcgagg agaacgaccc 840  
tggggagcag gccctcccag tgggggtgt ggagctgcgc ccagcagacc cccgcagta 900  
ccaggaggta cctciggacg aggctgtgac tctgcgggtg cctgacatgc cagtgcggcc 960  
cggccagctc tttagtgtc cctcctgtc tggcacaac ttcacagcca gcctcctgac 1020  
cctgcggatc aagggtgaaga aggggctgca tgtgacagcc gcccgcccag cccagcccac 1080  
actctggact gccaaagctag accgttcaa gggctccagg caccacacca cctcatcac 1140  
ctgccaccgt gctgggtca cagagccaga ttcagcagt cccctgaac tgtctgagtt 1200  
cctatgggtg gactttgtgg tggagaatag cactgggtgg ggcgtagcgg tcactgccc 1260  
cgtcacgtgg cagctggagt acccaggcca ggccccgaa gcagagaagg aaaaaatggt 1320  
gtgggaaatc ctggtgtctg agcgggacat cagagccctt atccactgg ccaaggctga 1380  
ggagctgggtg aatacagcac cactgactgg agtccccag catgtccccg tgcgccttgt 1440  
cactgtggac ggcggggggg ccttgggtga ggtgacagag catgtcggct gcgagtctgc 1500  
caacacacag gtctcagcagg tgtctgaggc ctgtgatgcc gtgttcgtgg ctggcaagga 1560  
gagccggggc gcccgggggg tgcgagtga cttctgtgg cgccggctcc gcgcctcgct 1620  
gcggctgacc gtgtgggccc cgctgctacc gctgcgtatc gagctaccg acaccacct 1680  
cgagcaggtc cgcggtgga gggtaacctg cctgtctgaa gggcctgcgg aaccgctgc 1740  
agaggcgta gatgaggccg agcggcgcg cctgtgtgc cactgcagt accagcgggc 1800  
cggtgtgcgc ttctcgcgc cctcgcggc ccaccgctg gacggcggcc gccgcctcac 1860  
gcacctgctt ggccccgact ggctgctaga cgtgtccac ctctggcgcc cacacgcccg 1920  
cgtgtggac tgcgtgtag cctctctgga ggggtggcgt gtcgtgtgg gccgggagcc 1980  
cgggtgcacc tccatgagg tgcgttccc actgtctgac tccatcctgg gggagcaggc 2040  
gctggctgtg acggacgaca aggtctcagt gctggagctg aggtgcagc cagtgtggg 2100  
catctcgctg acctgagcc ggggcactgc ccacccggg gaggcacag ctacgtgtg 2160  
ggcacagtca gcccttcccg ccccaaagca ggaggtggcc ctctccctat ggctgtcctt 2220

ctctgatcac acitggccc cagctgagct ctacgaccgc cgtgacctgg gactgtccgt 2280  
ctcagccgag gagcctgggtg ccatcctgcc agctgaggag cagggtgccc agctcggggt 2340  
ggtgggtgagt ggggcaggcg ccgaggggct gccgctgcat gtggctctgc acccgcccga 2400  
gccctgccgc cggggccgcc accgtgtgcc tctggcctct ggcaccgcct ggctggggct 2460  
gccccctgcc tccactccag cccctgtctt cccatccagc cctgcttgga gcccaccagc 2520  
cacagaagcc accatgggtg gtaaaccgca ggtggcaggc agtgtcgggg gcaacacagg 2580  
tgtgaggggc aagtittgagc gggcagagga ggaggccagg aaggaggaga ccgaagccag 2640  
ggaggaggag gaggaagagg aggaggagat ggtccctgcc cctcagcatg tcactgagct 2700  
agagctgggc atgtacgcc tgcctggagt ctcttgcgtg gccatcttca tcttcttggt 2760  
caatgggtgt gtcttcgtcc tgcgtatca gcgcaaagaa cctcccgaca gggccactga 2820  
ccccacctcc cccagcccc acaactgggt ctggctgggc actgaccagg aggaactgag 2880  
ccgccagctg gaccggcagt cccctggccc gcccaagggg gaggggagct gccctgtga 2940  
gagtggggga ggaggggagg cccctaccct ggccccctggc cctcctgggg gcaccaccag 3000  
ctcctcaagc accctggccc gaaaggaggc tggggggcgg cggaagcgag tagagtttgt 3060  
gacatttgtg ccagcccctc cagcccagtc acctgaggag cctgtagggg cccctgtgt 3120  
gcagtccatc cttgtggcag gcgaggagga catccgctgg gtgtgtgagg acatggggct 3180  
gaaggacctt gaggagcttc gcaactacat ggagaggatc cggggcagct cctgaccctc 3240  
cacagccacc tggtcagcca ccagctgggg caacgagggt ggaggtcca ctgagcctct 3300  
cgctgcccc cgccactcgt ctggctgctt tigtatcaag tcccctgcct ggtccccac 3360  
aaggactccc atccagcccc cctctgccc gcccttgtc atggacatg gtcgtgagga 3420  
agggtcatg ccccttattt atgggaacca tctcattcta acagaataaa ccgagaagga 3480  
aaccagaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3505

<210> 20

<211> 1023

<212> PRT

<213> Human

<400> 20

Met Cys Ala Arg Met Ala Gly Arg Thr Thr Ala Ala Pro Arg Gly Pro



5 10 15  
Tyr Gly Pro Trp Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Asp Val Val  
20 25 30  
Arg Val Asp Cys Gly Gln Ala Pro Leu Asp Pro Val Tyr Leu Pro Ala  
35 40 45  
Ala Leu Glu Leu Leu Asp Ala Pro Glu His Phe Arg Val Gln Gln Val  
50 55 60  
Gly His Tyr Pro Pro Ala Asn Ser Ser Leu Ser Ser Arg Ser Glu Thr  
65 70 75 80  
Phe Leu Leu Leu Gln Pro Trp Pro Arg Ala Gln Pro Leu Leu Arg Ala  
85 90 95  
Ser Tyr Pro Pro Phe Ala Thr Gln Gln Val Val Pro Pro Arg Val Thr  
100 105 110  
Glu Pro His Gln Arg Pro Val Pro Trp Asp Val Arg Ala Val Ser Val  
115 120 125  
Glu Ala Ala Val Thr Pro Ala Glu Pro Tyr Ala Arg Val Leu Phe His  
130 135 140  
Leu Lys Gly Gln Asp Trp Pro Pro Gly Ser Gly Ser Leu Pro Cys Ala  
145 150 155 160  
Arg Leu His Ala Thr His Pro Ala Gly Thr Ala His Gln Ala Cys Arg  
165 170 175  
Phe Gln Pro Ser Leu Gly Ala Cys Val Val Glu Leu Glu Leu Pro Ser  
180 185 190  
His Trp Phe Ser Gln Ala Ser Thr Thr Arg Ala Glu Leu Ala Tyr Thr  
195 200 205  
Leu Glu Pro Ala Ala Glu Gly Pro Gly Gly Cys Gly Ser Gly Glu Glu  
210 215 220  
Asn Asp Pro Gly Glu Gln Ala Leu Pro Val Gly Gly Val Glu Leu Arg  
225 230 235 240

Pro Ala Asp Pro Pro Gln Tyr Gln Glu Val Pro Leu Asp Glu Ala Val  
245 250 255

Thr Leu Arg Val Pro Asp Met Pro Val Arg Pro Gly Gln Leu Phe Ser  
260 265 270

Ala Thr Leu Leu Leu Gln His Asn Phe Thr Ala Ser Leu Leu Thr Leu  
275 280 285

Arg Ile Lys Val Lys Lys Gly Leu His Val Thr Ala Ala Arg Pro Ala  
290 295 300

Gln Pro Thr Leu Trp Thr Ala Lys Leu Asp Arg Phe Lys Gly Ser Arg  
305 310 315 320

His His Thr Thr Leu Ile Thr Cys His Arg Ala Gly Leu Thr Glu Pro  
325 330 335

Asp Ser Ser Pro Leu Glu Leu Ser Glu Phe Leu Trp Val Asp Phe Val  
340 345 350

Val Glu Asn Ser Thr Gly Gly Gly Val Ala Val Thr Arg Pro Val Thr  
355 360 365

Trp Gln Leu Glu Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Glu Ala Glu Lys Asp Lys  
370 375 380

Met Val Trp Glu Ile Leu Val Ser Glu Arg Asp Ile Arg Ala Leu Ile  
385 390 395 400

Pro Leu Ala Lys Ala Glu Glu Leu Val Asn Thr Ala Pro Leu Thr Gly  
405 410 415

Val Pro Gln His Val Pro Val Arg Leu Val Thr Val Asp Gly Gly Gly  
420 425 430

Ala Leu Val Glu Val Thr Glu His Val Gly Cys Glu Ser Ala Asn Thr  
435 440 445

Gln Val Leu Gln Val Ser Glu Ala Cys Asp Ala Val Phe Val Ala Gly  
450 455 460

Lys Glu Ser Arg Gly Ala Arg Gly Val Arg Val Asp Phe Trp Trp Arg

465                      470                      475                      480  
Arg Leu Arg Ala Ser Leu Arg Leu Thr Val Trp Ala Pro Leu Leu Pro  
                         485                      490                      495  
Leu Arg Ile Glu Leu Thr Asp Thr Thr Leu Glu Gln Val Arg Gly Trp  
                         500                      505                      510  
Arg Val Pro Gly Pro Ala Glu Gly Pro Ala Glu Pro Ala Ala Glu Ala  
                         515                      520                      525  
Ser Asp Glu Ala Glu Arg Arg Ala Arg Gly Cys His Leu Gln Tyr Gln  
                         530                      535                      540  
Arg Ala Gly Val Arg Phe Leu Ala Pro Phe Ala Ala His Pro Leu Asp  
545                      550                      555                      560  
Gly Gly Arg Arg Leu Thr His Leu Leu Gly Pro Asp Trp Leu Leu Asp  
                         565                      570                      575  
Val Ser His Leu Val Ala Pro His Ala Arg Val Leu Asp Ser Arg Val  
                         580                      585                      590  
Ala Ser Leu Glu Gly Gly Arg Val Val Val Gly Arg Glu Pro Gly Val  
                         595                      600                      605  
Thr Ser Ile Glu Val Arg Ser Pro Leu Ser Asp Ser Ile Leu Gly Glu  
                         610                      615                      620  
Gln Ala Leu Ala Val Thr Asp Asp Lys Val Ser Val Leu Glu Leu Arg  
625                      630                      635                      640  
Val Gln Pro Val Met Gly Ile Ser Leu Thr Leu Ser Arg Gly Thr Ala  
                         645                      650                      655  
His Pro Gly Glu Val Thr Ala Thr Cys Trp Ala Gln Ser Ala Leu Pro  
                         660                      665                      670  
Ala Pro Lys Gln Glu Val Ala Leu Ser Leu Trp Leu Ser Phe Ser Asp  
                         675                      680                      685  
His Thr Val Ala Pro Ala Glu Leu Tyr Asp Arg Arg Asp Leu Gly Leu  
                         690                      695                      700

Ser Val Ser Ala Glu Glu Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ala Glu Glu Gln  
705 710 715 720  
Gly Ala Gln Leu Gly Val Val Val Ser Gly Ala Gly Ala Glu Gly Leu  
725 730 735  
Pro Leu His Val Ala Leu His Pro Pro Glu Pro Cys Arg Arg Gly Arg  
740 745 750  
His Arg Val Pro Leu Ala Ser Gly Thr Ala Trp Leu Gly Leu Pro Pro  
755 760 765  
Ala Ser Thr Pro Ala Pro Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Trp Ser Pro  
770 775 780  
Pro Ala Thr Glu Ala Thr Met Gly Gly Lys Arg Gln Val Ala Gly Ser  
785 790 795 800  
Val Gly Gly Asn Thr Gly Val Arg Gly Lys Phe Glu Arg Ala Glu Glu  
805 810 815  
Glu Ala Arg Lys Glu Glu Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
820 825 830  
Glu Glu Glu Met Val Pro Ala Pro Gln His Val Thr Glu Leu Glu Leu  
835 840 845  
Gly Met Tyr Ala Leu Leu Gly Val Phe Cys Val Ala Ile Phe Ile Phe  
850 855 860  
Leu Val Asn Gly Val Val Phe Val Leu Arg Tyr Gln Arg Lys Glu Pro  
865 870 875 880  
Pro Asp Ser Ala Thr Asp Pro Thr Ser Pro Gln Pro His Asn Trp Val  
885 890 895  
Trp Leu Gly Thr Asp Gln Glu Glu Leu Ser Arg Gln Leu Asp Arg Gln  
900 905 910  
Ser Pro Gly Pro Pro Lys Gly Glu Gly Ser Cys Pro Cys Glu Ser Gly  
915 920 925  
Gly Gly Gly Glu Ala Pro Thr Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gly Gly Thr

930                      935                      940  
 Thr Ser Ser Ser Ser Thr Leu Ala Arg Lys Glu Ala Gly Gly Arg Arg  
 945                      950                      955                      960  
 Lys Arg Val Glu Phe Val Thr Phe Ala Pro Ala Pro Pro Ala Gln Ser  
                     965                      970                      975  
 Pro Glu Glu Pro Val Gly Ala Pro Ala Val Gln Ser Ile Leu Val Ala  
                     980                      985                      990  
 Gly Glu Glu Asp Ile Arg Trp Val Cys Glu Asp Met Gly Leu Lys Asp  
                     995                      1000                      1005  
 Pro Glu Glu Leu Arg Asn Tyr Met Glu Arg Ile Arg Gly Ser Ser  
                     1010                      1015                      1020

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 3069

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 21

atgtgcgcgc ggatggccgg tcgcacaaca gcggccctc gggggcccta cggccctgg 60  
 ctctgcctcc tggatggcct cgccctggac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc 120  
 ctggaccctg tctacctgcc ggcagccctg gagctcctag acgcccctga acacttccgt 180  
 gtgcagcagg tgggccacia cccacctgcc aactcctctc tgagctcccg atctgagacc 240  
 tttctgctcc tacagccctg gcccagggcc cagccacttc tccgggcctc ctaccacct 300  
 tttgccactc agcaggtagt ccccccctga gtcactgagc cccaccaacg gccagtccca 360  
 tgggacgtgc gggccgtttc agtggaaagc gctgtgactc cagcagagcc ctacgcccgg 420  
 gtctctcttc accicaaagg gcaggattgg ccaccagggt ctggcagcct gccctgtgcc 480  
 cggctccatg ccacacaccc tgcaggcact gtcaccaag cctgccgctt ccagccatcc 540  
 ctgggcgcct gcgtggigga gctggagctt ccttcgactt ggtttctaca ggcctccacc 600  
 acacgggccc agctggccta cacgcttgag cctgcagctg agggccctgg gggctgtggc 660  
 tccggcgagg agaacgaccc tggggagcag gccctcccag tggggggtgt ggagctgcgc 720

ccagcagacc ccccgagta ccaggaggia cctctggacg aggctgtgac tctgcgggtg 780  
cctgacatgc cagtgcggcc cggccagctc tttagtgtca cctcctgtct tcagcacaac 840  
ttcacagcca gcctcctgac cctgcggatc aaggigaaga aggggctgca tgtgacagcc 900  
gccccccag ccagcccac actctggact gccaagctag accgcttcaa gggctccagg 960  
caccacacca cctcatcac ctgccaccgt gctgggctca cagagccaga ttccagtcct 1020  
cttgaactgt ctgagttcct atgggtggac tttgtgggtg agaatagcac tgggtggggc 1080  
gtagcgggtca ctgccccgt cacgtggcag ctggagtacc caggccaggc cctgaagca 1140  
gagaaggaca aaatgggtgt ggaaatcctg gtgtctgagc gggacatcag agcccttatc 1200  
ccactggcca aggctgagga gctgggtgaat acagcaccac tgactggagt gccccagcat 1260  
gtccccgtgc gcctgtcac tgtggacggc gggggggcct tgggtggagt gacagagcat 1320  
gtcggctgcg agctgtccaa cacacaggtc ctgcaggtgt ctgaggcctg tgatgccgtg 1380  
ttcgtggctg gcaaggagag ccggggcgcc cgggggggtg gagtggactt ctgggtggcg 1440  
cggctccgcg cctcgttcg gctgaccgtg tgggcccccc tgctaccgt gcgtatcgag 1500  
ctcaccgaca ccacctcga gcaggctcgc ggctggaggg tacctggccc tgcigaagg 1560  
cctgcggaac ccgtgcaga ggcgtcggat gaggccgagc ggcgcgcccg tggctgccac 1620  
ctgcagtacc agcgggcccgt tgtgcgttc ctgccccct tcgcggccca cccgtggac 1680  
ggcggccgc gcctcacga cctgcttggc cccgactggc tgctagacgt gtcccacctc 1740  
gtggcgccac acgcccgcgt gctggactcg cgtgtagcct ctctggaggg tggcgtgtc 1800  
gtgggtggcc gggagcccgt tgtcacctcc attgagggtc gtccccact gtctgactcc 1860  
atcctggggg agcaggcgct ggctgtgacg gacgacaagg tctcagtgtt ggagctgagg 1920  
gtgcagccag tgaatggcat ctgctgacc ttgagccggg gcactgcca cccgggggag 1980  
gtcacagcta cgtgctgggc acagtacgc ctccccgcc caaagcagga ggtggccctc 2040  
tcctatggc tgtccttctc tgatcacact gttggcccag ctgagctcta cgaccgccgt 2100  
gacctgggac tgtccgtctc agccgaggag cctgggtgcca tcctgccagc tgaggagcag 2160  
ggtgcccagc tcgggggtgt ggtgagtggg gcaggcgccg aggggctgcc gctgcatgtg 2220  
gtctgtcacc cggccgagcc ctgccgccg ggccgccacc gtgtgcctct ggccctctggc 2280  
accgctggc tggggctgcc cctgcttcc actccagccc ctgctctccc atccagccct 2340  
gcttggagcc caccagccac agaagccacc atgggtggta aacggcaggt ggcaggcagt 2400  
gtcgggggca acacagggtt gaggggcaag tttgagcggg cagaggagga ggccaggaag 2460

gaggagacca aaccagggga ggaggaggag gaagaggagg aggagatggt ccctgccccct 2520  
cagcatgtca ctgagctaga gctgggcatg tacgccctgc tgggagtcct ctgcgtggcc 2580  
atcttcattc tcttgggtcaa tgggtgtggc ttcgtcctgc gctatcagcg caaagaacct 2640  
cccgacagtg ccactgaccc caccctcccc cagccccaca actgggtctg gctgggcact 2700  
gaccaggagg aactgagccg ccagctggac cggcagtcct ctggccccgc caagggggag 2760  
gggagctgcc cctgtgagag tgggggagga ggggaggccc ctacctggc ccctggccct 2820  
cctgggggca ccaccagctc ctcaagcacc ctggcccgaa aggaggctgg ggggcggcgg 2880  
aagcgagtag agtttgtgac atttgcgcca gcccctccag ccagtcacc tgaggagcct 2940  
gtagggggccc ctgctgtgca gtccatcctt gtggcaggcg aggaggacat ccgctgggtg 3000  
tgtgaggaca tggggctgaa ggacctgag gagcttcgca actacaigga gaggatccgg 3060  
ggcagctcc 3069

<210> 22

<211> 1019

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

Met Ala Gly Arg Thr Thr Ala Ala Pro Arg Gly Pro Tyr Gly Pro Trp

5 10 15

Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Asp Val Val Arg Val Asp Cys

20 25 30

Gly Gln Ala Pro Leu Asp Pro Val Tyr Leu Pro Ala Ala Leu Glu Leu

35 40 45

Leu Asp Ala Pro Glu His Phe Arg Val Gln Gln Val Gly His Tyr Pro

50 55 60

Pro Ala Asn Ser Ser Leu Ser Ser Arg Ser Glu Thr Phe Leu Leu Leu

65 70 75 80

Gln Pro Trp Pro Arg Ala Gln Pro Leu Leu Arg Ala Ser Tyr Pro Pro

85 90 95

Phe Ala Thr Gln Gln Val Val Pro Pro Arg Val Thr Glu Pro His Gln  
100 105 110

Arg Pro Val Pro Trp Asp Val Arg Ala Val Ser Val Glu Ala Ala Val  
115 120 125

Thr Pro Ala Glu Pro Tyr Ala Arg Val Leu Phe His Leu Lys Gly Gln  
130 135 140

Asp Trp Pro Pro Gly Ser Gly Ser Leu Pro Cys Ala Arg Leu His Ala  
145 150 155 160

Thr His Pro Ala Gly Thr Ala His Gln Ala Cys Arg Phe Gln Pro Ser  
165 170 175

Leu Gly Ala Cys Val Val Glu Leu Glu Leu Pro Ser His Trp Phe Ser  
180 185 190

Gln Ala Ser Thr Thr Arg Ala Glu Leu Ala Tyr Thr Leu Glu Pro Ala  
195 200 205

Ala Glu Gly Pro Gly Gly Cys Gly Ser Gly Glu Glu Asn Asp Pro Gly  
210 215 220

Glu Gln Ala Leu Pro Val Gly Gly Val Glu Leu Arg Pro Ala Asp Pro  
225 230 235 240

Pro Gln Tyr Gln Glu Val Pro Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Arg Val  
245 250 255

Pro Asp Met Pro Val Arg Pro Gly Gln Leu Phe Ser Ala Thr Leu Leu  
260 265 270

Leu Gln His Asn Phe Thr Ala Ser Leu Leu Thr Leu Arg Ile Lys Val  
275 280 285

Lys Lys Gly Leu His Val Thr Ala Ala Arg Pro Ala Gln Pro Thr Leu  
290 295 300

Trp Thr Ala Lys Leu Asp Arg Phe Lys Gly Ser Arg His His Thr Thr  
305 310 315 320

Leu Ile Thr Cys His Arg Ala Gly Leu Thr Glu Pro Asp Ser Ser Pro



325 330 335  
Leu Glu Leu Ser Glu Phe Leu Trp Val Asp Phe Val Val Glu Asn Ser  
340 345 350  
Thr Gly Gly Gly Val Ala Val Thr Arg Pro Val Thr Trp Gln Leu Glu  
355 360 365  
Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Glu Ala Glu Lys Asp Lys Met Val Trp Glu  
370 375 380  
Ile Leu Val Ser Glu Arg Asp Ile Arg Ala Leu Ile Pro Leu Ala Lys  
385 390 395 400  
Ala Glu Glu Leu Val Asn Thr Ala Pro Leu Thr Gly Val Pro Gln His  
405 410 415  
Val Pro Val Arg Leu Val Thr Val Asp Gly Gly Gly Ala Leu Val Glu  
420 425 430  
Val Thr Glu His Val Gly Cys Glu Ser Ala Asn Thr Gln Val Leu Gln  
435 440 445  
Val Ser Glu Ala Cys Asp Ala Val Phe Val Ala Gly Lys Glu Ser Arg  
450 455 460  
Gly Ala Arg Gly Val Arg Val Asp Phe Trp Trp Arg Arg Leu Arg Ala  
465 470 475 480  
Ser Leu Arg Leu Thr Val Trp Ala Pro Leu Leu Pro Leu Arg Ile Glu  
485 490 495  
Leu Thr Asp Thr Thr Leu Glu Gln Val Arg Gly Trp Arg Val Pro Gly  
500 505 510  
Pro Ala Glu Gly Pro Ala Glu Pro Ala Ala Glu Ala Ser Asp Glu Ala  
515 520 525  
Glu Arg Arg Ala Arg Gly Cys His Leu Gln Tyr Gln Arg Ala Gly Val  
530 535 540  
Arg Phe Leu Ala Pro Phe Ala Ala His Pro Leu Asp Gly Gly Arg Arg  
545 550 555 560

Leu Thr His Leu Leu Gly Pro Asp Trp Leu Leu Asp Val Ser His Leu

565

570

575

Val Ala Pro His Ala Arg Val Leu Asp Ser Arg Val Ala Ser Leu Glu

580

585

590

Gly Gly Arg Val Val Val Gly Arg Glu Pro Gly Val Thr Ser Ile Glu

595

600

605

Val Arg Ser Pro Leu Ser Asp Ser Ile Leu Gly Glu Gln Ala Leu Ala

610

615

620

Val Thr Asp Asp Lys Val Ser Val Leu Glu Leu Arg Val Gln Pro Val

625

630

635

640

Met Gly Ile Ser Leu Thr Leu Ser Arg Gly Thr Ala His Pro Gly Glu

645

650

655

Val Thr Ala Thr Cys Trp Ala Gln Ser Ala Leu Pro Ala Pro Lys Gln

660

665

670

Glu Val Ala Leu Ser Leu Trp Leu Ser Phe Ser Asp His Thr Val Ala

675

680

685

Pro Ala Glu Leu Tyr Asp Arg Arg Asp Leu Gly Leu Ser Val Ser Ala

690

695

700

Glu Glu Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ala Glu Glu Gln Gly Ala Gln Leu

705

710

715

720

Gly Val Val Val Ser Gly Ala Gly Ala Glu Gly Leu Pro Leu His Val

725

730

735

Ala Leu His Pro Pro Glu Pro Cys Arg Arg Gly Arg His Arg Val Pro

740

745

750

Leu Ala Ser Gly Thr Ala Trp Leu Gly Leu Pro Pro Ala Ser Thr Pro

755

760

765

Ala Pro Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Trp Ser Pro Pro Ala Thr Glu

770

775

780

Ala Thr Met Gly Gly Lys Arg Gln Val Ala Gly Ser Val Gly Gly Asn



&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 3057

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 23

```
atggccggtc gcacaacagc ggcccctcgg gggccctacg gcccctggct ctgcctcctg      60
gtggccctcg ccctggacgt cgtgagagtg gactgtggcc aggctcccct ggaccctgtc     120
tacctgccgg cagcccttga gctcctagac gcccctgaac acttccgtgt gcagcaggig     180
ggccactacc cacctgccaa ctccctcttg agctcccgat ctgagacctt tctgtctcta     240
cagccctggc ccagggccca gccactctc cgggcctcct acccaccttt tgccactcag     300
caggtgggtc cccctcgagt cactgagccc caccaacggc cagtcccatg ggacgtgcgg     360
gccgtttcag tggaaagcggc tgtgactcca gcagagccct acgcccgggt tctcttccac     420
ctcaaagggc aggattggcc accagggctt ggcagcctgc cctgtgcccg gctccatgcc     480
acacaccctg caggcactgc tcaccaagcc tgccgcttcc agccatccct gggcgccctg     540
gtggtggagc tggagcttcc ctgcactgg ttctcacagg cctccaccac acggggccgag     600
ctggcctaca cgcttgagcc tgcagctgag ggccctgggg gctgtggctc cggcgaggag     660
aacgaccctg gggagcaggc cctcccagtg gggggtgttg agctgcgccc agcagacccc     720
ccgcagtacc aggaggtacc tctggacgag gctgtgactc tgcgggtgcc tgacatgcca     780
gtgcggcccc gccagctctt tagtgctacc ctctgtctc agcacaactt cacagccagc     840
ctcctgaccc tgcggatcaa ggtgaagaag gggctgcatg tgacagccgc ccgcccagcc     900
cagcccacac tctggactgc caagctagac cgcttcaagg gctccaggca ccacaccacc     960
ctcatcacct gccaccgtgc tgggctcaca gagccagatt ccagtcccct tgaactgtct    1020
gagttcctat ggggtggactt tgtggtggag aatagcactg gtgggggcgt agcggtcact    1080
cgccccgtca cgtggcagct ggagtacca ggccaggccc ctgaagcaga gaaggacaaa    1140
atgggtgtgg aaatcctggt gctctagcgg gacatcagag cccttatccc acttgccaag    1200
gctgaggagc tggatgaata agcaccactg actggagtgc cccagcatgt ccccgctgcg     1260
cttgtcactg tggacggcgg gggggccttg gtggaggatga cagagcatgt cggctgcgag    1320
tctgccaaca cacaggctct gcagggtgtt gaggcctgtg atgccgtgtt cgtggctggc    1380
```

aaggagagcc ggggcgcccc gggggtgcga gtggacttct ggtggcgccg gctccgcgcc 1440  
tcgctgcggc tgaccgtgtg ggcccccttg ctaccgttgc gtatcgagct caccgacacc 1500  
accttcgagc aggtccgcgg ctggagggtta cctggccctg ctgaaggggc tgcggaaccc 1560  
gctgcagagg cgtcggatga ggccgagcgg cgcgcccgtg gctgccacct gcagtaccag 1620  
cgggcccgtg tgcgtttcct cgcccccttc ggggccacc cgctggacgg cggccgccgc 1680  
ctcacgcacc tgcttggccc cgactggctg ctagacgtgt cccacctcgt ggcgccacac 1740  
gcccgcgtgc tggactcgcg tgtagcctct ctggagggtg gccgtgtcgt ggtgggcccg 1800  
gagcccgtg tcacctccat tgagggtcgt tccccactgt ctgactccat cctgggggag 1860  
caggcgctgg ctgtgacgga cgacaaggtc tcagtgtctg agctgagggt gcagccagt 1920  
atgggcatct cgctgacctt gagccggggc actgcccacc ccggggagggt cacagctacg 1980  
tgctgggcac agtcagccct tccgccccca aagcaggagg tggccctctc cctatggctg 2040  
tccttctctg atcacactgt ggccccagct gagctctacg accgccgtga cctgggactg 2100  
tccgtctcag ccgaggagcc tggtgccatc ctgccagctg aggagcaggg tgcccagctc 2160  
ggggtggtgg tgagtggggc aggcgcccag gggctgccgc tgcattgtgg tctgcacccg 2220  
cccagccct gccgcccggg ccgccaccgt gtgcccttgg cctctggcac cgcttggctg 2280  
gggctgcccc ctgccctccac tccagccctt gctctcccat ccagccctgc ttggagccca 2340  
ccagccacag aagccacat ggggtggtaaa cggcagggtg caggcagtgt cgggggcaac 2400  
acagggtgtga ggggcaagtt tgagcgggca gaggaggagg ccaggaagga ggagacaaaa 2460  
cccaggaggagg aggaggagga agaggaggag gagatgggtc ctgccccctca gcatgtcact 2520  
gagctagagc tgggcatgta cgccctgctg ggagtcttct gcgtggccat ctcatcttc 2580  
ttgggtcaatg gtgtgggtctt cgtcctgcgc tatcagcgca aagaacctcc cgacagtgcc 2640  
actgacccca cctcccccca gcccacaaac tgggtctggc tgggcaciga ccaggaggaa 2700  
ctgagccgcc agctggaccg gcagtccctt ggcccggcca agggggaggg gagctgcccc 2760  
tgtgagagtg ggggaggagg ggaggccctt acctggccc ctggccctcc tgggggcacc 2820  
accagctcct caagcaccct ggcccgaag gaggttggg ggccggcgga gcgagtagag 2880  
tttgtacat ttgcgccagc cctccagcc cagtcacctg aggagcctgt aggggcccct 2940  
gctgtgcagt ccatccttgt ggcaggcgag gaggacatcc gctgggtgtg tgaggacatg 3000  
gggctgaagg acctgagga gcttcgcaac tacatggaga ggatccgggg cagctcc 3057

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 3502

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 24

```
attgtctggg aattgcagcc gcggggcggg cggcggcggc ggccggcggc gccgggaccc 60
agcggggccag gtggggacgg cgcggagcgg gtgcgggaga tgccgtgcgg gactggggcc 120
acctgagccg cccgcctcgt ccccgccctc tgtgggaagg atgtgcgcgc ggatggccgg 180
tcgcacaaca gcggccctc gggggcccta cggcccttgg ctctgcctcc tgggtggccct 240
cgccctggac gtcgtgagag tggacigtgg ccaggctccc ctggaccctg tctacctgcc 300
ggcagccctg gagctcctag acgcccctga acacttcctg gtgcagcagg tgggccacta 360
cccaccigcc aactcctctc tgagctcccg atctgagacc tttctgctcc tacagccctg 420
gccaggggcc cagccacttc tccgggcctc ctaccacct tttgccactc agcagggtgt 480
ccccctcga gtcactgagc cccaccaacg gccagtccca tgggacgtgc gggccgtttc 540
agtggaagcg gctgtgactc cagcagagcc ctacgcccg gttctcttcc acctcaaagg 600
gcaggattgg ccaccagggt ctggcagcct gccctgtgcc cggctccaig ccacacaccc 660
tgcaggcact gctaccaag cctgccgtt ccagccatcc ctgggcgcct gcgtggtgga 720
gtggagctt cctcgcact ggttctcaca ggctccacc acacgggccc agctggccct 780
cacgttgag cctgcagctg agggccctgg gggctgtggc tccggcgagg agaacgaccc 840
tggggagcag gccctcccag tgggggggtg ggagctgcgc ccagcagacc cccgcagta 900
ccaggaggta cctctggacg aggctgtgac tctgcgggtg cctgacatgc cagtgcggcc 960
cggccagctc tttagtcta cctcctgtt tcagcacaac ttcacagcca gccctctgac 1020
cctgcgcatc aaggtgaaga aggggtgca tgtacagcc gcccgcccag ccagcccac 1080
actctggact gccaagctag accgctcaa gggctccagg caccacacca cctcatcac 1140
ctgccaccgt gctgggctca cagagccaga ttccagtccc ctggaactgt ctgagttcct 1200
atgggtggac tttgtggtg agaatagcac tgggtggggc gtagcggta ctgcctccgt 1260
cacgtggcag ctggagtacc caggccaggc ccctgaagca gagaaggaca aaatggigtg 1320
ggaaatcctg gtgtctgagc gggacatcag agcccttacc ccactggcca aggctgagga 1380
gctggtgaat acagcaccac tgactggagt gcccagcat gtcccgctgc gccttgtcac 1440
```

tgtggacggc gggggggcct tggaggagt gacagagcat gtcggctgcg agtcigccaa 1500  
cacacaggtc ctgcagggtg ctgaggcctg tgatgccgtg ttcgtggctg gcaaggagag 1560  
ccggggcgcc cgggggggtgc gaggaggact ctggaggcgc cggctccgcg cctcgctgcg 1620  
gctgaccgtg tggggcccc tgctaccgtt gcgtatcgag ctacccgaca ccacctcga 1680  
gcaggctccg ggctggaggg tactggccc tgctgaaggg cctgcggaac ccgtgcaga 1740  
ggcgtcggat gaggccgagc ggcgcgcccg tggctgccac ctgcagtacc agcgggcccg 1800  
tgtgcgttc ctgccccct tcgcggccca cccgtggac ggcgggccg gcctcacga 1860  
cctgcttggc cccgactggc tgctagacgt gtccaccctc gtggcgccac acgcccgcgt 1920  
gtggactcg cgtgtagcct ctctggaggg tggccgtgtc gtggggggc gggagcccgg 1980  
tgtaccctc attgagggtc gtcccccact gtctgactcc atcctggggg agcaggcgct 2040  
ggctgtgacg gacgacaagg tctcagtgtt ggagctgagg gtgcagccag tgatgggcat 2100  
ctcgctgacc ttgagccggg gcactgccc ccccggggag gtcacagcta cgtgctgggc 2160  
acagtcagcc ctcccgccc caaagcagga ggtggccctc tccctatggc tgtccttctc 2220  
tgatcacact gtggccccag ctgagctcta cgaccgccgt gacctgggac tgtccgtctc 2280  
agccgaggag cctgggtgcca tccgtccagc tgaggagcag ggtgcccagc tcgggggtgt 2340  
ggtgagtggg gcaggcgccg aggggctgcc gctgcatgtg gctctgcacc cgcccagacc 2400  
ctgccgcccg ggccgccacc gtgtgcctct ggctcttggc accgcctggc tggggctgcc 2460  
ccctgcctcc aciccagccc ctgctctccc atccagccct gcttggagcc caccagccac 2520  
agaagccacc atgggtggta aacggcaggt ggcaggcagt gtcgggggca acacagggt 2580  
gaggggcaag tttagcggg cagaggagga ggccaggaag gaggagacca aaccaggga 2640  
ggaggaggag gaagaggagg aggagatggt cctgccccct cagcatgtca ctgagctaga 2700  
gctgggcatg tacgccctgc tgggagtctt ctgcgtggcc atcttcatct tcttggtaaa 2760  
tggtgtggtc ttcgtcctgc gctatcagc caaagaacct cccgacagtg ccactgacc 2820  
cacctcccc cagccccaca actgggtctg gctgggcact gaccaggagg aactgagccg 2880  
ccagctggac cggcagtcct ctggcccgcc caagggggag gggagctgcc cctgtgagag 2940  
tgggggagga ggggaggccc ctacctggc ccttggccct cctgggggca ccaccagctc 3000  
ctcaagcacc ctggcccgaa aggaggctgg gggcgggcgg aagcgagtag agtttgtac 3060  
atttgcgcca gcccctccag ccagtcacc tgaggagcct gtagggggcc ctgctgtgca 3120  
gtccatccit gtggcaggcg aggaggacat ccgttgggtg tgtaggaca tggggctgaa 3180

ggaccctgag gagcttcgca actacatgga gaggatccgg ggcagctcct gaccctccac 3240  
agccacctgg tcagccacca gctggggcaa cgagggtgga ggtccctactg agcctctcgc 3300  
ctgccccgc cactcgtctg gtgcttggtg atccaagtcc cctgacctggt cccccacaag 3360  
gactcccatc caggccccct ctgccctgcc ccttgtcatg gaccatggtc gtgaggaagg 3420  
gctcatgccc cttatttatg ggaaccatct cattctaaca gaataaacg agaaggaaac 3480  
cagaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 3502

<210> 25

<211> 1023

<212> PRT

<213> Human

<400> 25

Met Cys Ala Arg Met Ala Gly Arg Thr Thr Ala Ala Pro Arg Gly Pro

5

10

15

Tyr Gly Pro Trp Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Asp Val Val

20

25

30

Arg Val Asp Cys Gly Gln Ala Pro Leu Asp Pro Val Tyr Leu Pro Ala

35

40

45

Ala Leu Glu Leu Leu Asp Ala Pro Glu His Phe Arg Val Gln Gln Val

50

55

60

Gly His Tyr Pro Pro Ala Asn Ser Ser Leu Ser Ser Arg Ser Glu Thr

65

70

75

80

Phe Leu Leu Leu Gln Pro Trp Pro Arg Ala Gln Pro Leu Leu Arg Ala

85

90

95

Ser Tyr Pro Pro Phe Ala Thr Gln Gln Val Val Pro Pro Arg Val Thr

100

105

110

Glu Pro His Gln Arg Pro Val Pro Trp Asp Val Arg Ala Val Ser Val

115

120

125

Glu Ala Ala Val Thr Pro Ala Glu Pro Tyr Ala Arg Val Leu Phe His



130 135 140  
Leu Lys Gly Gln Asp Trp Pro Pro Gly Ser Gly Ser Leu Pro Cys Ala  
145 150 155 160  
Arg Leu His Ala Thr His Pro Ala Gly Thr Ala His Gln Ala Cys Arg  
165 170 175  
Phe Gln Pro Ser Leu Gly Ala Cys Val Val Glu Leu Glu Leu Pro Ser  
180 185 190  
His Trp Phe Ser Gln Ala Ser Thr Thr Arg Ala Glu Leu Ala Tyr Thr  
195 200 205  
Leu Glu Pro Ala Ala Glu Gly Pro Gly Gly Cys Gly Ser Gly Glu Glu  
210 215 220  
Asn Asp Pro Gly Glu Gln Ala Leu Pro Val Gly Gly Val Glu Leu Arg  
225 230 235 240  
Pro Ala Asp Pro Pro Gln Tyr Gln Glu Val Pro Leu Asp Glu Ala Val  
245 250 255  
Thr Leu Arg Val Pro Asp Met Pro Val Arg Pro Gly Gln Leu Phe Ser  
260 265 270  
Ala Thr Leu Leu Leu Arg His Asn Phe Thr Ala Ser Leu Leu Thr Leu  
275 280 285  
Arg Ile Lys Val Lys Lys Gly Leu His Val Thr Ala Ala Arg Pro Ala  
290 295 300  
Gln Pro Thr Leu Trp Thr Ala Lys Leu Asp Arg Phe Lys Gly Ser Arg  
305 310 315 320  
His His Thr Thr Leu Ile Thr Cys His Arg Ala Gly Leu Thr Glu Pro  
325 330 335  
Asp Ser Ser Pro Leu Glu Leu Ser Glu Phe Leu Trp Val Asp Phe Val  
340 345 350  
Val Glu Asn Ser Thr Gly Gly Gly Val Ala Val Thr Arg Pro Val Thr  
355 360 365

61/78

Trp Gln Leu Glu Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Glu Ala Glu Lys Asp Lys  
370 375 380  
Met Val Trp Glu Ile Leu Val Ser Glu Arg Asp Ile Arg Ala Leu Ile  
385 390 395 400  
Pro Leu Ala Lys Ala Glu Glu Leu Val Asn Thr Ala Pro Leu Thr Gly  
405 410 415  
Val Pro Gln His Val Pro Val Arg Leu Val Thr Val Asp Gly Gly Gly  
420 425 430  
Ala Leu Val Glu Val Thr Glu His Val Gly Cys Glu Ser Ala Asn Thr  
435 440 445  
Gln Val Leu Gln Val Ser Glu Ala Cys Asp Ala Val Phe Val Ala Gly  
450 455 460  
Lys Glu Ser Arg Gly Ala Arg Gly Val Arg Val Asp Phe Trp Trp Arg  
465 470 475 480  
Arg Leu Arg Ala Ser Leu Arg Leu Thr Met Trp Ala Pro Leu Leu Pro  
485 490 495  
Leu Arg Ile Glu Leu Thr Asp Thr Thr Leu Glu Gln Val Arg Gly Trp  
500 505 510  
Arg Val Pro Gly Pro Ala Glu Gly Pro Ala Glu Pro Ala Ala Glu Ala  
515 520 525  
Ser Asp Glu Ala Glu Arg Arg Ala Arg Gly Cys His Leu Gln Tyr Gln  
530 535 540  
Arg Ala Gly Val Arg Phe Leu Ala Pro Phe Ala Ala His Pro Leu Asp  
545 550 555 560  
Gly Gly Arg Arg Leu Thr His Leu Leu Gly Pro Asp Trp Leu Leu Asp  
565 570 575  
Val Ser His Leu Val Ala Pro His Ala Arg Val Leu Asp Ser Arg Val  
580 585 590  
Ala Ser Leu Glu Gly Gly Arg Val Val Val Gly Arg Glu Pro Gly Val

595 600 605  
Thr Ser Ile Glu Val Arg Ser Pro Leu Ser Asp Ser Ile Leu Gly Glu  
610 615 620  
Gln Ala Leu Ala Val Thr Asp Asp Lys Val Ser Val Leu Glu Leu Arg  
625 630 635 640  
Val Gln Pro Val Met Gly Ile Ser Leu Thr Leu Ser Arg Gly Thr Ala  
645 650 655  
His Pro Gly Glu Val Thr Ala Thr Cys Trp Ala Gln Ser Ala Leu Pro  
660 665 670  
Ala Pro Lys Gln Glu Val Ala Leu Ser Leu Trp Leu Ser Phe Ser Asp  
675 680 685  
His Thr Val Ala Pro Ala Glu Leu Tyr Asp Arg Arg Asp Leu Gly Leu  
690 695 700  
Ser Val Ser Ala Glu Glu Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ala Glu Glu Gln  
705 710 715 720  
Gly Ala Gln Leu Gly Val Val Val Ser Gly Ala Gly Ala Glu Gly Leu  
725 730 735  
Pro Leu His Val Ala Leu His Pro Pro Glu Pro Cys Arg Arg Gly Arg  
740 745 750  
His Arg Val Pro Leu Ala Ser Gly Thr Ala Trp Leu Gly Leu Pro Pro  
755 760 765  
Ala Ser Thr Pro Ala Pro Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Trp Ser Pro  
770 775 780  
Pro Ala Thr Glu Ala Thr Met Gly Gly Lys Arg Gln Val Ala Gly Ser  
785 790 795 800  
Val Gly Gly Asn Thr Gly Val Arg Gly Lys Phe Glu Arg Ala Glu Glu  
805 810 815  
Glu Ala Arg Lys Glu Glu Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Glu Glu  
820 825 830

Glu Glu Glu Met Val Pro Ala Pro Gln His Val Thr Glu Leu Glu Leu

835

840

845

Gly Met Tyr Ala Leu Leu Gly Val Phe Cys Val Ala Ile Phe Ile Phe

850

855

860

Leu Val Asn Gly Val Val Phe Val Leu Arg Tyr Gln Arg Lys Glu Pro

865

870

875

880

Pro Asp Ser Ala Thr Asp Pro Thr Ser Pro Gln Pro His Asn Trp Val

885

890

895

Trp Leu Gly Thr Asp Gln Glu Glu Leu Ser Arg Gln Leu Asp Arg Gln

900

905

910

Ser Pro Gly Pro Pro Lys Gly Glu Gly Ser Cys Pro Cys Glu Ser Gly

915

920

925

Gly Gly Gly Glu Ala Pro Thr Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gly Gly Thr

930

935

940

Thr Ser Ser Ser Ser Thr Leu Ala Arg Lys Glu Ala Gly Gly Arg Arg

945

950

955

960

Lys Arg Val Glu Phe Val Thr Phe Ala Pro Ala Pro Pro Ala Gln Ser

965

970

975

Pro Glu Glu Pro Val Gly Ala Pro Ala Val Gln Ser Ile Leu Val Ala

980

985

990

Gly Glu Glu Asp Ile Arg Trp Val Cys Glu Asp Met Gly Leu Lys Asp

995

1000

1005

Pro Glu Glu Leu Arg Asn Tyr Met Glu Arg Ile Arg Gly Ser Ser

1010

1015

1020

<210> 26

<211> 3069

<212> DNA

<213> Human

&lt;400&gt; 26

atgtgcgcgc ggaatggccgg tcgcacaaca gcggccctc gggggcccta cggcccttgg 60  
ctctgccctc tggiggccct cggcctggac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc 120  
ctggaccctg tctacctgcc ggcagccctg gagctcctag acgccccga acacttccgt 180  
gtgcagcagg tgggccacta cccacctgcc aactcctcic tgagctcccg atctgagacc 240  
tttctgctcc tacagccctg gccagggcc cagccacttc tccgggcctc ctaccacct 300  
tttgccactc agcaggtggg cccccctga gtcactgagc cccaccaacg gccagtccca 360  
tgggacgtgc gggccgtttc agtgggaagcg gctgtgactc cagcagagcc ctacgcccgg 420  
gttctcttcc acctcaaagg gcaggattgg ccaccagggt ctggcagcct gccctgtgcc 480  
cggctccatg ccacacacc tgcgggact gctaccaag cctgccgtt ccagccatcc 540  
ctgggcgcct gcgtgggtga gctggagctt cctcgcact ggttctcaca ggcctccacc 600  
acacgggccc agctggccta cagcttgag cctgcagctg agggccctgg gggctgtggc 660  
tccggcgagg agaacgacc tggggagcag gccctcccag tgggggggtgt ggagctgcgc 720  
ccagcagacc cccgcagta ccaggaggta cctctggacg aggcctgac tctgcgggtg 780  
cctgacatgc cagtgcggcc cggccagctc tttagtcta cctcctgct tcggcacaac 840  
ttcacagcca gcctcctgac cctgcggatc aaggtaaga aggggctgca tgtgacagcc 900  
gcccggccag cccagccac actctggact gccaaagtgg accgcttcaa gggctccagg 960  
caccacacca cctcatcac ctgccaccgt gctgggctca cagagccaga ttccagtccc 1020  
cttgaactgt ctgagttcct atgggtggac tttgtgtgg agaatagcac tgggtggggc 1080  
gtagcggta ctcgccccgt cagtgccag ctggagtacc caggccaggc ccctgaagca 1140  
gagaaggaca aaatgggtgt ggaaatcctg gtgtctgagc gggacatcag agcccttacc 1200  
ccactggcca aggcctgagga gctggatgaat acagcaccac tgactggagt gcccagcat 1260  
gtccccgtgc gccttgtcac tgtggacggc gggggggcct tgggtggagg gacagagcat 1320  
gtcggctgcg agctgccaa cacacaggtc ctgcaggtgt ctgaggcctg tgatgccgtg 1380  
ttcgtggctg gcaaggagag cgggggcgcc cgggggggtgc gactggactt ctggtggcgc 1440  
cggctccgcg cctcgtgctg gctgaccatg tgggcccccc tgcctaccgt gcgtatcag 1500  
ctcaccgaca ccacctga gcaggtccgc ggctggaggg tacctggccc tgcgaaggg 1560  
cctgcggaac ccgtgcaga ggctcgat gaggccgagc ggccgccccg tggctgccac 1620  
ctgcagtacc agcgggcccg tgtgcgttc ctcgccccct tcggggcca cccgtggac 1680

ggcggccgcc gcctcacgca cctgcttggc cccgactggc tgctagacgt gtcccacctc 1740  
gtggcgccac acgcccgcgt gctggactcg cgtgtagcct ctctggaggg tggccgtgtc 1800  
gtggtggggc gggagcccgg tgtcacctcc attgaggtgc gttccccact gtctgactcc 1860  
atcctggggg agcaggcgct ggcigtgacg gacgacaagg tctcagtgtt ggagctgagg 1920  
gtgcagccag tgatgggcat ctgctgacc ttgagccggg gcactgcca ccccggggag 1980  
gtcacagctt cgtgtctggc acagtacgc cttcccgcc caaagcagga ggtggccctc 2040  
tccctatggc tgtccttctc tgatcacact gtggccccag ctgagctcta cgaccgccgt 2100  
gacctgggac tgtccgtctc agccgaggag cctgggtgcca tcttgccagc tgaggagcag 2160  
ggtgcccagc tcgggggtgt ggtgagtggg gcaggcgccg aggggctgcc gctgcatgtg 2220  
gctctgcacc cgcccagacc ctgccgccgg ggccgccacc gtgtgcctct ggccctctggc 2280  
accgcctggc tggggctgcc ccttgccctc actccagccc ctgctctccc atccagccct 2340  
gcttggagcc caccagccac agaagccacc atgggttggt aacggcaggt ggcaggcagt 2400  
gtcgggggca acacaggtgt gaggggcaag tttagacggg cagaggagga ggccaggaag 2460  
gaggagacca aaccagggga ggaggaggag gaagaggagg aggagatggt ccctgcccc 2520  
cagcatgtca ctgagctaga gctgggcatg tacgccctgc tgggagtctt ctgctgtggc 2580  
atcttcatct tcttgggtcaa tgggtgtgtc ttcgtcctgc gctatcagcg caaagaacct 2640  
cccacagtg ccactgaccc cacctcccc cagccccaca actgggtctg gctgggcact 2700  
gaccaggagg aactgagccg ccagctggac cggcagtcct ctggcccgcc caagggggag 2760  
gggagctgcc cctgtgagag tgggggagga ggggaggccc ctaccctggc ccctggccct 2820  
cctgggggca ccaccagctc ctcaagcacc ctggcccgaa aggaggctgg gggcgggcgg 2880  
aagcgagtag agtttgtgac atttgcgcca gcccctccag ccagtcacc tgaggagcct 2940  
gtagggggccc ctgctgtgca gtccatccct gtggcaggcg aggaggacat ccgctgggtg 3000  
tgtgaggaca tggggctgaa ggaccctgag gagcttcgca actacatgga gaggatccgg 3060  
ggcagctcc 3069

<210> 27

<211> 1019

<212> PRT

<213> Human

&lt;400&gt; 27

Met Ala Gly Arg Thr Thr Ala Ala Pro Arg Gly Pro Tyr Gly Pro Trp

5 10 15

Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Asp Val Val Arg Val Asp Cys

20 25 30

Gly Gln Ala Pro Leu Asp Pro Val Tyr Leu Pro Ala Ala Leu Glu Leu

35 40 45

Leu Asp Ala Pro Glu His Phe Arg Val Gln Gln Val Gly His Tyr Pro

50 55 60

Pro Ala Asn Ser Ser Leu Ser Ser Arg Ser Glu Thr Phe Leu Leu Leu

65 70 75 80

Gln Pro Trp Pro Arg Ala Gln Pro Leu Leu Arg Ala Ser Tyr Pro Pro

85 90 95

Phe Ala Thr Gln Gln Val Val Pro Pro Arg Val Thr Glu Pro His Gln

100 105 110

Arg Pro Val Pro Trp Asp Val Arg Ala Val Ser Val Glu Ala Ala Val

115 120 125

Thr Pro Ala Glu Pro Tyr Ala Arg Val Leu Phe His Leu Lys Gly Gln

130 135 140

Asp Trp Pro Pro Gly Ser Gly Ser Leu Pro Cys Ala Arg Leu His Ala

145 150 155 160

Thr His Pro Ala Gly Thr Ala His Gln Ala Cys Arg Phe Gln Pro Ser

165 170 175

Leu Gly Ala Cys Val Val Glu Leu Glu Leu Pro Ser His Trp Phe Ser

180 185 190

Gln Ala Ser Thr Thr Arg Ala Glu Leu Ala Tyr Thr Leu Glu Pro Ala

195 200 205

Ala Glu Gly Pro Gly Gly Cys Gly Ser Gly Glu Glu Asn Asp Pro Gly

210 215 220

Glu Gln Ala Leu Pro Val Gly Gly Val Glu Leu Arg Pro Ala Asp Pro  
225 230 235 240  
Pro Gln Tyr Gln Glu Val Pro Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Arg Val  
245 250 255  
Pro Asp Met Pro Val Arg Pro Gly Gln Leu Phe Ser Ala Thr Leu Leu  
260 265 270  
Leu Arg His Asn Phe Thr Ala Ser Leu Leu Thr Leu Arg Ile Lys Val  
275 280 285  
Lys Lys Gly Leu His Val Thr Ala Ala Arg Pro Ala Gln Pro Thr Leu  
290 295 300  
Trp Thr Ala Lys Leu Asp Arg Phe Lys Gly Ser Arg His His Thr Thr  
305 310 315 320  
Leu Ile Thr Cys His Arg Ala Gly Leu Thr Glu Pro Asp Ser Ser Pro  
325 330 335  
Leu Glu Leu Ser Glu Phe Leu Trp Val Asp Phe Val Val Glu Asn Ser  
340 345 350  
Thr Gly Gly Gly Val Ala Val Thr Arg Pro Val Thr Trp Gln Leu Glu  
355 360 365  
Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Glu Ala Glu Lys Asp Lys Met Val Trp Glu  
370 375 380  
Ile Leu Val Ser Glu Arg Asp Ile Arg Ala Leu Ile Pro Leu Ala Lys  
385 390 395 400  
Ala Glu Glu Leu Val Asn Thr Ala Pro Leu Thr Gly Val Pro Gln His  
405 410 415  
Val Pro Val Arg Leu Val Thr Val Asp Gly Gly Gly Ala Leu Val Glu  
420 425 430  
Val Thr Glu His Val Gly Cys Glu Ser Ala Asn Thr Gln Val Leu Gln  
435 440 445  
Val Ser Glu Ala Cys Asp Ala Val Phe Val Ala Gly Lys Glu Ser Arg



450 455 460  
Gly Ala Arg Gly Val Arg Val Asp Phe Trp Trp Arg Arg Leu Arg Ala  
465 470 475 480  
Ser Leu Arg Leu Thr Met Trp Ala Pro Leu Leu Pro Leu Arg Ile Glu  
485 490 495  
Leu Thr Asp Thr Thr Leu Glu Gln Val Arg Gly Trp Arg Val Pro Gly  
500 505 510  
Pro Ala Glu Gly Pro Ala Glu Pro Ala Ala Glu Ala Ser Asp Glu Ala  
515 520 525  
Glu Arg Arg Ala Arg Gly Cys His Leu Gln Tyr Gln Arg Ala Gly Val  
530 535 540  
Arg Phe Leu Ala Pro Phe Ala Ala His Pro Leu Asp Gly Gly Arg Arg  
545 550 555 560  
Leu Thr His Leu Leu Gly Pro Asp Trp Leu Leu Asp Val Ser His Leu  
565 570 575  
Val Ala Pro His Ala Arg Val Leu Asp Ser Arg Val Ala Ser Leu Glu  
580 585 590  
Gly Gly Arg Val Val Val Gly Arg Glu Pro Gly Val Thr Ser Ile Glu  
595 600 605  
Val Arg Ser Pro Leu Ser Asp Ser Ile Leu Gly Glu Gln Ala Leu Ala  
610 615 620  
Val Thr Asp Asp Lys Val Ser Val Leu Glu Leu Arg Val Gln Pro Val  
625 630 635 640  
Met Gly Ile Ser Leu Thr Leu Ser Arg Gly Thr Ala His Pro Gly Glu  
645 650 655  
Val Thr Ala Thr Cys Trp Ala Gln Ser Ala Leu Pro Ala Pro Lys Gln  
660 665 670  
Glu Val Ala Leu Ser Leu Trp Leu Ser Phe Ser Asp His Thr Val Ala  
675 680 685

Pro Ala Glu Leu Tyr Asp Arg Arg Asp Leu Gly Leu Ser Val Ser Ala  
690 695 700

Glu Glu Pro Gly Ala Ile Leu Pro Ala Glu Glu Gln Gly Ala Gln Leu  
705 710 715 720

Gly Val Val Val Ser Gly Ala Gly Ala Glu Gly Leu Pro Leu His Val  
725 730 735

Ala Leu His Pro Pro Glu Pro Cys Arg Arg Gly Arg His Arg Val Pro  
740 745 750

Leu Ala Ser Gly Thr Ala Trp Leu Gly Leu Pro Pro Ala Ser Thr Pro  
755 760 765

Ala Pro Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Trp Ser Pro Pro Ala Thr Glu  
770 775 780

Ala Thr Met Gly Gly Lys Arg Gln Val Ala Gly Ser Val Gly Gly Asn  
785 790 795 800

Thr Gly Val Arg Gly Lys Phe Glu Arg Ala Glu Glu Glu Ala Arg Lys  
805 810 815

Glu Glu Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Met  
820 825 830

Val Pro Ala Pro Gln His Val Thr Glu Leu Glu Leu Gly Met Tyr Ala  
835 840 845

Leu Leu Gly Val Phe Cys Val Ala Ile Phe Ile Phe Leu Val Asn Gly  
850 855 860

Val Val Phe Val Leu Arg Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Pro Asp Ser Ala  
865 870 875 880

Thr Asp Pro Thr Ser Pro Gln Pro His Asn Trp Val Trp Leu Gly Thr  
885 890 895

Asp Gln Glu Glu Leu Ser Arg Gln Leu Asp Arg Gln Ser Pro Gly Pro  
900 905 910

Pro Lys Gly Glu Gly Ser Cys Pro Cys Glu Ser Gly Gly Gly Gly Glu

915                      920                      925  
 Ala Pro Thr Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gly Gly Thr Thr Ser Ser Ser  
 930                      935                      940  
 Ser Thr Leu Ala Arg Lys Glu Ala Gly Gly Arg Arg Lys Arg Val Glu  
 945                      950                      955                      960  
 Phe Val Thr Phe Ala Pro Ala Pro Pro Ala Gln Ser Pro Glu Glu Pro  
 965                      970                      975  
 Val Gly Ala Pro Ala Val Gln Ser Ile Leu Val Ala Gly Glu Glu Asp  
 980                      985                      990  
 Ile Arg Trp Val Cys Glu Asp Met Gly Leu Lys Asp Pro Glu Glu Leu  
 995                      1000                      1005  
 Arg Asn Tyr Met Glu Arg Ile Arg Gly Ser Ser  
 1010                      1015

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 3057

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 28

atggccggtc gcacaacagc ggccccctcgg gggccctacg gcccctggct ctgcctcctg 60  
 gtggccctcg cccctggacgt cgtgagagtg gactgtggcc aggcctccct ggaccctgtc 120  
 tacctgccgg cagccctgga gctcctagac gccctgaac acttccgtgt gcagcaggtg 180  
 ggccactacc caccigccaa ctccctctctg agctcccgat ctgagacctt tctgtccta 240  
 cagccctggc ccagggccca gccacttctc cgggcctcct acccaccitt tgcactcag 300  
 cagggtggtc cccctcgagt cactgagccc caccaacggc cagtcccatg ggacgtgcgg 360  
 gccgtttcag tggaagcggc tgtgactcca gcagagccct acgccgggt tctcttcac 420  
 ctcaaagggc aggatggcc accagggtct ggcagcctgc cctgtgcccg gctccatgcc 480  
 acacaccctg ccggcacigc tcaccaagcc tgccgcttcc agccatccct gggcgccctgc 540  
 gtgggtggagc tggagcttcc ctgcactgg ttctcacagg cctccaccac acgggcccag 600

ctggcctaca cgcttgagcc tgcagctgag ggccctgggg gctgtggctc cggcgaggag 660  
aacgacctg gggagcaggc cctcccagtg gggggtgtgg agctgcgccc agcagacccc 720  
ccgcagtiacc aggaggtiacc tctggacgag gctgtgactc tgcgggtgcc tgacatgcca 780  
gtgcggcccg gccagctctt tagtgctacc ctctgtctc ggcacaactt cacagccagc 840  
ctctgaccc tgcggatcaa ggtgaagaag gggctgcatg tgacagccgc ccgcccagcc 900  
cagcccacac tctggactgc caagctggac cgcttcaagg gctccaggca ccacaccacc 960  
ctcatcacct gccaccgtgc tgggctcaca gagccagatt ccagtcacct tgaactgtct 1020  
gagttcctat ggggtgactt tgtgtggag aatagcactg gtgggggcgt agcggctact 1080  
cgccccgtca cgiggcagct ggagtacca ggccaggccc ctgaagcaga gaaggacaaa 1140  
atggtgtggg aaatcctggt gtctgagcgg gacatcagag cccttatccc actggccaag 1200  
gctgaggagc tggatgaatac agcaccactg actggagtgc ccagcatgt ccccgctgcg 1260  
cttctcactg tggacggcgg gggggccttg gtggaggtga cagagcatgt cggctgcgag 1320  
tctgccaaca cacaggtcct gcaggtgtct gaggcctgtg atgccgtgtt cgtggctggc 1380  
aaggagagcc ggggcgcccc gggggtgcga gtggacttct ggtggcgccg gctccgcgcc 1440  
tcgctgcggc tgaccatgtg ggccccctg ctaccgtgc gtatcgagct caccgacacc 1500  
acctcgagc aggtccgcgg ctggagggtt cctggccctg ctgaagggcc tgcggaaccc 1560  
gctgcagagg cgtcgatga ggccgagcgg cgcgcccgtg gctgccacct gcagtaccag 1620  
cgggcccgtg tgcgttctt cgccccctc gcggcccacc cgtggacgg cggccgcgc 1680  
ctcacgcacc tgcctggccc cgactggctg ctgacgtgt cccacctgt ggcgccacac 1740  
gcccgcgtgc tggactcgcg ttagcctct ctggagggtg gccgtgtct ggtgggcccgg 1800  
gagcccgtg tcacctccat tgagggtcgt tcccactgt ctgactccat cctgggggag 1860  
caggcgttg ctgtgacgga cgacaaggct tcagtgttg agctgagggt gcagccagt 1920  
atgggcatct cgctgacct gagccggggc actgccacc ccggggaggt cacagctacg 1980  
tgctgggcac agtcagccct tcccggcca aagcaggagg tggccctct cctatggctg 2040  
tccttctctg atcacactgt ggccccagct gagctctac accgccgtga cctgggactg 2100  
tccgtctcag ccgaggagcc tgggtccatc ctgccagctg aggagcaggg tggccagctc 2160  
ggggtgtgtg ttagtggggc aggcgccgag gggctgccgc tgcattgtggc tctgcacccg 2220  
cccagaccc gccgcccggg ccgccaccgt gtgcctctgg cctctggcac cgcctggctg 2280  
gggctgcccc ctgcctccac tccagccct gctctccat ccagccctgc ttggagccca 2340

ccagccacag aagccacat ggggtggtaaa cggcaggtag caggcagtagt cgggggcaac 2400  
acaggtagtga ggggcaagtt tgagcgggca gaggaggagg ccaggaagga ggagaccaa 2460  
cccaggaggagg aggaggagga agaggaggag gagatggtag ctgccccca gcatgtcact 2520  
gagctagagc tgggcatgta cggcctgctg ggagcttctt gcgtggccat ctcatcttc 2580  
ttggtcaatg gtgtggtctt cgtcctgctg tatcagcga aagaacctcc cgacagtgcc 2640  
actgaccca cctccccca gcccacaac tgggtctggc tgggcactga ccaggaggaa 2700  
ctgagccgcc agctggaccg gcagtcctt ggcccgcca agggggaggg gagctgcccc 2760  
tgtgagagtg ggggaggagg ggaggccctt accctggccc ctggccctcc tgggggcacc 2820  
accagctcct caagcacctt ggcccgaag gaggttggg ggccggcgaa gcgagtagag 2880  
tttgtagcat ttgcgccagc cctccagcc cagtcacctg aggagcctgt aggggcccc 2940  
gctgtgcagt ccctcctgt ggcaggcgag gaggacatcc gctgggtgtg tgaggacatg 3000  
gggctgaagg accctgagga gcttcgcaac tacatggaga ggatccgggg cagctcc 3057

<210> 29

<211> 3502

<212> DNA

<213> Human

<400> 29

attgtctggg aattgcagcc gcggggcggg cggcgcgggc ggccggcgcc gccgggaccc 60  
agcggggccag gtggggacgg cgcggagcgg gtgcgggaga tgccgtgcgg gactggggcc 120  
acctgagccg cccgcctcgt cccgccttc tgtgggaagg atgtgcgcgc gcatggccgg 180  
tcgcacaaca gcggccccctc gggggcccta cggcccttgg ctctgcctcc tggtagccct 240  
cgccctggac gtcgtgagag tggactgtgg ccaggctccc ctggaccctg tctacctgcc 300  
ggcagccctg gagctcctag acgcccctga acacttccgt gtgcagcagg tgggccacta 360  
cccacctgcc aactcctctc tgagctcccg atctgagacc ttctgtctcc tacagccctg 420  
ggccaggggc cagccacttc tccgggcctc ctaccacct ttgtccactc agcaggtagt 480  
ccccctcga gtcactgagc cccaccaacg gccagtccca tgggacgtgc gggccgtttc 540  
agtgaagcg gctgtgactc cagcagagcc ctacgcccgg gtctctctcc acctcaaagg 600  
gcaggatagg ccaccagggt ctggcagcct gccctgtgcc cggctccatg ccacacacc 660

tgccggcact gctaccaag cctgccgctt ccagccatcc ctgggcgcct gcgtgggtgga 720  
gctggagcct cctcgcact ggttcacaca ggcctccacc acacgggccg agctggccta 780  
cacgcttgag cctgcagctg agggcccttg gggctgtggc tccggcgagg agaacgaccc 840  
tggggagcag gccctcccag tgggggggtg ggagctgcgc ccagcagacc ccccgagta 900  
ccaggaggta cctctggacg aggcctgtgac tctgcgggtg cctgacatgc cagtgcggcc 960  
cggccagctc tttagtgcta ccttcctgct tcggcacaac ttcacagcca gcctccigac 1020  
cctgcggatc aaggigaaga aggggctgca tgtgacagcc gcccgcccag ccagcccac 1080  
actctggact gccaaactgg accgcttcaa gggctccagg caccacacca cctcatcac 1140  
ctgccaccgt gctgggctca cagagccaga ttccagtcct ctgaactgt ctgagttcct 1200  
atgggtggac tttgtgttgg agaatagcac tgggtggggc gtagcggta ctgccccgt 1260  
cacgtggcag ctggagtacc caggccaggc cctgaagca gagaaggaca aaatggtgtg 1320  
ggaaatcctg gtgtctgagc gggacatcag agcccttacc ccactggcca aggctgagga 1380  
gctggtgaat acagcaccac tgactggagt gcccagcat gtccccgtgc gccttgtcac 1440  
tgtggacggc gggggggcct tgggtggagt gacagagcat gtcggctgcg agtctgcca 1500  
cacacaggtc ctgcagggtg ctgaggcctg tgatgccgtg ttcgtggctg gcaaggagag 1560  
ccggggcgcc cgggggggtg gagtggactt ctgggtggcg cggctccgcg cctcgtgcg 1620  
gtgaccatg tgggcccccc tgctaccgt gcgtatcgag ctcaccgaca ccaccctga 1680  
gcaggctccg ggctggaggg taccctggccc tgctgaagg cctgcggaac ccgctgcaga 1740  
ggcgtcggat gaggccgagc ggcgcgccc tggctgccac ctgcagtacc agcgggccgg 1800  
tgtgcgttc ctgccccct tcgcggcca cccgtggac ggcgcccgcc gcctcacgca 1860  
cctgcttggc cccgactggc tgctagacgt gtcccacctc gtggcgccac acgcccgcgt 1920  
gctggactcg cggttagcct cctcggaggg tggcgtgtc gtgggtggcc gggagcccgg 1980  
tgtcacctcc attgagggtg gttccccact gctgactcc atcctggggg agcaggcgct 2040  
ggctgtgacg gacgacaagg tctcagtgt ggagctgagg gtgcagccag tgatgggcat 2100  
ctcgtgacc ttgagccggg gcactgcca ccccggggag gtcacagcta cgtgctgggc 2160  
acagtcagcc ctccccccc caaagcagga ggtggccctc tccctatggc tgtccttctc 2220  
tgatcacact gtggccccag ctgagctcta cgaccgccgt gacctgggac tgtccgtctc 2280  
agccgaggag cctggtgcca tcctgccagc tgaggagcag ggtgcccagc tcgggggtgt 2340  
ggtgagtggg gcaggcgccg aggggctgcc gctgcatgtg gctctgcacc cgcccgagcc 2400

ctgccgccgg ggccgccacc gtgtgcctct ggccctcggc accgcctggc tggggctgcc 2460  
 cccctgcctcc actccagccc ctgctctccc atccagccct gcttggagcc caccagccac 2520  
 agaagccacc atgggtggta aacggcaggt ggcaggcagt gtcgggggca acacaggtgt 2580  
 gaggggcaag tttagcggg cagaggagga ggccaggaag gaggagacca aaccagggga 2640  
 ggaggaggag gaagaggagg aggagatggt ccctgcccct cagcatgtca ctgagctaga 2700  
 gctgggcatg tacgccctgc tgggagctt ctgcgtggcc atcttcatct tcttggtaaa 2760  
 tgggtgtgtc ttctctctgc gctatcagcg caaagaacct cccgacagt ccactgacct 2820  
 caccctcccc cagccccaca actgggtctg gctgggcact gaccaggagg aactgagccg 2880  
 ccagctggac cggcagctcc ctggcccgc caagggggag gggagctgcc cctgtgagag 2940  
 tgggggagga ggggaggccc ctaccctggc cctggccct cctgggggca ccaccagctc 3000  
 ctcaagcacc ctggcccgaa aggaggctgg ggggcggcgg aagcgagtag agtttgtgac 3060  
 atttgcgcca gcccctccag cccagtcacc tgaggagcct gtaggggccc ctgctgtgca 3120  
 gtccatcctt gtggcaggcg aggaggacat ccgctgggtg tgtgaggaca tggggctgaa 3180  
 ggacctgag gagcttcgca actacatgga gaggatccgg ggcagctcct gaccctccac 3240  
 agccacctgg tcagccacca gctggggcaa cgagggtgga ggtccactg agcctctcgc 3300  
 ctgccccgc cactcgtctg gtgcttgttg atccaagtcc cctgcctggt cccccacaag 3360  
 gactccatc caggccccct ctgcccctgc cctgtcatg gaccatggct gtgaggaagg 3420  
 gctcatgccc cttatttatg ggaaccatct cattctaaca gaataaacg agaaggaaac 3480  
 cagaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 3502

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 30

attgaggtgc gtccccact

20

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 31

ccactcacca ccaccccgag ct

22

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 32

tatgaattca tgtgcgcgcg gatg

24

<210> 33

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 33

tattatctag aggagctgcc ccggatcct

29

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 34



ccttctgtgg gaaggaigtg

20

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 35

·tggctgtgga gggtcaggag ct

22

<210> 36

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 36

tcggctgcga gtctgcc

17

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 37

ctctccttgc cagccacg

18

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 38

tgctgaggc ctgtgatgcc gtg

23

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 39

tatgaattca tgtgcgcgcg gatg

24

<210> 40

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer

<400> 40

tatttctaga tcaggagctg ccccgatc

29

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 41

Gly Ser Gly Glu Glu Asn Asp Pro Gly Glu Gln Ala Leu Pro Cys

5

10

15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 42

Gly Pro Ala Glu Gly Pro Ala Glu Pro Ala Ala Glu Ala Ser Cys

5

10

15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 43

Gly Ser Val Gly Gly Asn Thr Gly Val Arg Gly Lys Phe Glu Cys

5

10

15

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 44

cttgggtcaat ggtgtggtct

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10532

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/82, 16/32, C12P21/02, C12Q1/68, A61P35/00, 43/00, A61K31/7088, 38/17, 39/395, 45/00, 48/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/82 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI/BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/74836 A1 (HYSEQ, INC.), 11 October, 2001 (11.10.01), Seq.ID.No.180 & EP 1254266 A1 & US 2002/0061567 A1	3-5, 8-19, 21-22, 24-25, 35-40, 42-43, 50
X	WO 00/35937 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 22 June, 2000 (22.06.00), Seq.ID.No.41 & EP 1140970 A1 & JP 2002-532083 A & CA 2362423 A	3-5, 8-19, 21-22, 24-25, 35-40, 42-43, 50
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 25 November, 2003 (25.11.03)		Date of mailing of the international search report 09 December, 2003 (09.12.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10532

## Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what compounds correspond thereto. Such being the case, no meaningful search can be made on the inventions as claimed in the above claims.

## Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

"SEQ ID NO:10", "SEQ ID NOS:15 and 16", "SEQ ID NOS:17 and 18", "SEQ ID NOS:20 and 21", "SEQ ID NOS:22 and 23", "SEQ ID NOS:25 and 26" and "SEQ ID NOS:27 and 28" are considered as individual groups of inventions. Thus, the application has "10" groups of inventions.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10532

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20, 48, 49

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as claimed in claims 20, 48 and 49 pertain to "methods for treatment of the human body by surgery or therapy as well as diagnostic methods" as specified in the PCT Rule 39.1(iv).

2. ☒ Claims Nos.: 23, 26, 27, 41 and 44

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The description presents no example of a compound obtained by the screening method or kit as claimed in claims 23, 26, 27, 41 and 44. Thus, claims 23, 26, 27, 41 and 44 are neither supported by the description nor disclosed therein. Even though the common technical (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Although the proteins/polynucleotides represented by the SEQ ID NOS as set forth in claims are common to each other in showing elevated expression in a human cancer tissue, this point had been publicly known prior to the priority date of the present case.

Thus, it does not appear that the inventions relating to the proteins/polynucleotides represented by the above SEQ ID NOS, considered as a whole, make any contribution over the prior art. These inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

Such being the case, the parts relating respectively to "SEQ ID NO:1", "SEQ ID NOS:4 and 5", "SEQ ID NOS:7 and 8", (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

The parts relating to SEQ ID NOS:4 and 5 in claims 1 to 19, 21 to 22, 24 to 25, 35 to 40, 42 to 43, 45 to 47 and 50.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/82; 16/32,  
C12P21/02, C12Q1/68; A61P35/00, 43/00,  
A61K31/7088, 38/17, 39/395, 45/00, 48/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/82

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),  
EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/74836 A1 (HYSEQ, INC.) 2001.10.11 Seq. ID. No. 180 & EP 1254266 A1 & US 2002/0061567 A1	3-5, 8-19, 21- 22, 24-25, 35- 40, 42-43, 50
X	WO 00/35937 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2000.06.22 Seq. ID. No. 41 & EP 1140970 A1 & JP 2002-532083 A & CA 2362423 A	3-5, 8-19, 21- 22, 24-25, 35- 40, 42-43, 50

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 11. 03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20, 48, 49 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲20, 48, 49に記載されている発明は、PCT規則39.1(iv)の「人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法」に該当する。
2. ☒ 請求の範囲 23, 26, 27, 41, 44 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
明細書には、請求の範囲23, 26, 27, 41, 44に記載のスクリーニング方法又はキットにより得られる化合物として具体的なものが一切記載されていない。よって、請求の範囲23, 26, 27, 41, 44は明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案してもいかなる化合物が該当するのか全く不明である。よって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査ができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲に記載された各配列番号で表されるタンパク質/ポリヌクレオチドは、いずれもヒト癌組織で発現が増加する点で共通してはいるものの、この点は本願優先日前に公知である。

よって、上記各配列番号のタンパク質/ポリヌクレオチドに係る発明は、全体として先行技術に対して行う貢献があるとは認められず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

したがって、請求の範囲のうち「配列番号1」、「配列番号4, 5」、「配列番号7, 8」、「配列番号10」、「配列番号15, 16」、「配列番号17, 18」、「配列番号20, 21」、「配列番号22, 23」、「配列番号25, 26」及び「配列番号27, 28」に係る部分がそれぞれ1発明と認められるから、本出願に係る発明の数は「10」と認める。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-19, 21-22, 24-25, 35-40, 42-43, 45-47, 50の配列番号4, 5に係る部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。